

16 MAY 2005

PCT/RU03/00473

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ
(РОСПАТЕНТ)

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ
ПРОМЫШЛЕННОЙ СОБСТВЕННОСТИ

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 123995
Телефон 240 60 15. Телекс 114818 ПДЧ. Факс 243 33 37

REC'D 24 FEB 2004

WIPO

PCT

Наш № 20/12-44

«28» января 2004 г.

С П Р А В К А

Федеральный институт промышленной собственности (далее – Институт) настоящим удостоверяет, что приложенные материалы являются точным воспроизведением первоначального описания, формулы, реферата и чертежей (если имеются) заявки № 2002129774 на выдачу патента на изобретение, поданной в Институт в ноябре месяце 10 дня 2002 года (10.11.2002).

Название изобретения:

Композиция с антиоксидантными свойствами и способ лечения болезней млекопитающих

Заявитель:

Институт биофизики клетки РАН

Действительные авторы:

НОВОСЕЛОВ Владимир Иванович
ЯНИН Владимир Алексеевич
ФЕСЕНКО Евгений Евгеньевич

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Заведующий отделом 20



А.Л.Журавлев

BEST AVAILABLE COPY

2002129774



A61K31/00, A61K 38/05

Композиция с антиоксидантными свойствами и способ лечения болезней млекопитающих.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу и фармацевтической композиции, предназначенным для профилактики и/или лечения патологий, которые частично или полностью вызваны нарушением баланса между окислительными и антиоксидантными процессами в клетках и организмах млекопитающих.

Предшествующий уровень техники

Существующая в организме млекопитающих антиоксидантная система защиты является важным звеном, обеспечивающим динамическое постоянство состава клеток и жидкостных сред организма, включая кровь и лимфу. Антиокислительные внутриклеточные ферментные системы противодействуют окислительному стрессу и обезвреживают активные формы кислорода. Важное место в этом отношении занимают органы дыхания, которые имеют эффективную эндогенную антиоксидантную защиту в респираторной системе (Bauer V. et al., 1999).

Под воздействием окислительного стресса клетка утрачивает регуляторные функции, что влияет на функциональные свойства ферментов, белков и рибонуклеиновых кислот и это, в конечном итоге, может привести к возникновению лавинообразных процессов гибели клеток.

Баланс между формированием активных форм кислорода и эндогенной антиоксидантной защитой нарушается вследствие многих заболеваний или за счет воздействия на организм эндогенных или экзогенных факторов. Нарушение баланса

вызывается при: а) бактериальном или вирусном заражении, б) действии термических и/или химических факторов (ожог, отморожение) в) механических повреждений (раны, переломы, ушибы), г) воздействии ионизирующей и неионизирующей радиации.

Разработка эффективных лекарств, которые способствуют профилактике или лечению заболеваний, сопровождаемых гиперпродукцией свободных радикалов, является важной задачей фармакологии.

Обычно под термином “антиоксидант” понимают вещество, которое снижает уровень или предотвращает образование активных радикалов или активных форм кислорода.

Известен широкий спектр заболеваний, для лечения которых антиоксидантные препараты подтвердили свою эффективность (Babish J.G. et al. PCT Appl. WO0230419, 2002). К таким заболеваниям относятся: а) болезни легких, б) болезни печени, в) болезни почек, г) болезни кишечного тракта, д) болезни иммунной системы, е) болезни нервной системы, ж) болезни глаз, з) воспалительные процессы, и) болезни сердца, к) вирусные инфекции, например СПИД и другие.

Существует несколько подходов в поисках антиоксидантов, повышающих эффективность лечения или профилактики болезней вызываемых как экзогенными, так и эндогенными факторами.

Известно применение низкомолекулярных антиоксидантов, как гидрофильной, так и гидрофобной природы. К ним относятся а- токоферол, убихиноны, N-ацетилцистеин, глютатион (Gillissen A. et al., 1998; Kelly F.J., 1999; Tabot O. et al., US Pat. 6,187,743, 2001). Известно применение низкомолекулярных пептидов, которые имеют антиоксидантную активность (McLean et al., US Pat. 5,683,982, 1997). К общему недостатку использования низкомолекулярных антиоксидантов можно отнести то, что они обладают достаточно низкой антиоксидантной активностью и не эффективны при тяжелых патологиях.

Другой подход связан с применением антиоксидантов, обладающих высокой степенью антиоксидантной активности.

Известно применение тиоредоксина, который индуцирует синтез клеточного антиоксиданта MnSOD при лечении клеток эпителия легкого (White K. et al. US Pat. 5,985,261, 1999), или применение рекомбинантного SOD для профилактики болезней легких (Davis J.M. et al. 1993). К общему недостатку применения известных высокомолекулярных ферментов относится их узкий спектр действия. Известны примеры комбинированного применения низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов, например, для защиты клеток от действия свободных радикалов (Hellstrand, K. et al. 2001), или для лечения конкретных заболеваний, например, сосудов (Vita J.A. et al., 2001).

Следует отметить, что широко используемые для профилактики и терапии препараты антиоксидантной терапии такие, как α -токоферол, каротиноиды, флавоноиды, пробукол в основном взаимодействуют с радикалами локализованными в гидрофобной зоне клеточных мембран и липопротеинов. В то же время гиперпродукция свободных радикалов в первой фазе воспалительных заболеваний локализуется в водной фазе, где наибольшей активностью обладают гидрофильные перехватчики активных форм кислорода.

В настоящее время открыт новый класс природных антиоксидантов, хорошо растворимых в воде, обладающих широким спектром антиоксидантной активности и исследованных в экспериментах *in vitro*. К такому классу относятся тиол-специфические антиоксиданты или пероксиредоксины, которые способны нейтрализовать как органические, так и неорганические соединения в широком диапазоне их концентрации (Chae H.Z. et al., 1994; McGonigle S. et al., 1998). Из экспериментов *in vitro* известно, что многие из пероксиредоксинов участвуют в

процессе пролиферации клеток (Prosperi M.T. et al., 1993; Pesenko I.V. et al., 1998; Novoselov S.V. et al., 1999).

Известны публикации, в которых изучалась роль пероксидоксинов в клетках при дисфункциях вызванных: артеросклерозом (Butterfield L.H., 1999), раком (Chung Y.M. et al., 2001; Kinnula V.L. et al., 2002), нервными заболеваниями (Kim S.H. et al., 2001), болезнями легких (Das K.C. et al., 2001; Kim H.S. et al., 2002), болезни почек (Fujii T., 2001) болезнями кожи (Lee S.C. et al., 2000), ионизирующей радиацией (Park S.H. et al., 2000).

Отмечая важную роль синтеза пероксидоксинов в клетках в ответ на оксидантный стресс, авторы публикаций предлагали повышать содержание разных типов пероксидоксинов в самой клетке.

Известен способ лечения, основанный на повышении уровня пероксидоксина в клетке с помощью генной терапии. Для этой цели используют вектор, созданный генноинженерным способом, с помощью которого трансформируют клетки животных. В состав вектора введен ген, кодирующий последовательность пероксидоксина, выделенного из гельминтов (Chandrashekhar R. et al., US Patent 6,352,836, 2002). Одновременно с применением вектора авторы предлагают дополнительно использовать белок в качестве средства для стимуляции иммунной системы животных.

Следует отметить, что применение генотерапии для лечения млекопитающих не получило быстрого развития из-за дороговизны и выявления большого числа побочных эффектов.

Известны опыты по прямому применению натуральных пероксидоксинов (РтхVI) при лечении химических ожогов органов дыхания крыс (Novoselov V.I. et al., 2000). Недостатком такого способа являлась дороговизна получения натурального пероксидоксина в препаративных количествах.

Известен способ для лечения вирусных заболеваний, в том числе СПИДа (HIV-1), в котором, в качестве основного компонента лекарственного средства, используют рекомбинантные пероксиредоксины, имеющие протеазную активность (Walker B.D., Lynn R. G. , 2002). Авторы обнаружили противовирусные свойства пероксиредоксинов по защите клеточных мембран от проникновения вирусов в клетку. С этой целью основным способом лечения является создание во всем организме млекопитающего максимальной концентрации пероксиредоксина (10 μ g/ml) на длительное время, которое требуется для ингибирования действия вирусных частиц и восстановления функций организма. Это соответствует введению разовой дозы от 100 до 1000 mg пероксиредоксина в зависимости от веса пациента. Известно, что известный натуальный и рекомбинантный пероксиредоксин типа PrxVI подвержен действию протеаз (Андреева С.Г. и др., 1998). Учитывая длительность процесса лечения HIV-1, воздействие протеаз на биологическую активность рекомбинантного пероксиредоксина и необходимость многократного введения доз для поддержания исходной концентрации, общее количество рекомбинантного пероксиредоксина может превысить сотни грамм на одного пациента.

Сущность изобретения

Сущностью данного изобретения является способ и композиция для защиты клеток, тканей и организма в целом от гиперпродукции свободных радикалов, вызываемых экзогенными и эндогенными факторами.

Повышение антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма млекопитающих обеспечивают за счет контакта эффективного количества пероксиредоксина или пероксиредоксина и активатора с межклеточным пространством.

Причем контакт с межклеточным пространством ткани, органа или организма в целом осуществляют либо посредством пассивной или активной диффузии при

аппликациях или распылении, либо за счет доставки с помощью инъекций в кровь, лимфу, спинномозговую жидкость.

Для доставки используют парентеральное или эндолюмбальное введение с помощью инъекции или используют парентеральное введение с помощью инфузий, ингаляций, введение в дренаж, или используют сублингвальный, вагинальный, ректальный ввод, или используют капли в нос или глаза.

Дополнительно используют терапевтический агент, который применяют одновременно, или предварительно, или после применения композиции, включающей пероксиредоксин. Терапевтический агент выбирают из группы состоящей из: i) антибактериальных, антивирусных, антигрибных, антигистаминных препаратов, ii) высокомолекулярных ферментов, которые обеспечивают дополнительную защиту от свободных радикалов, iii) низкомолекулярных соединений, обеспечивающих дополнительное снижение уровня свободных радикалов внутри клетки, iv) препаратов используемых для трансплантации или криоконсервации органов, v) биологически активных белков, vi) гормонов, vii) витаминов.

Антиоксидантную защиту от экзогенных и/или эндогенных факторов, вызывающих патологию, осуществляют предварительно и/или в процессе развития патологии и/или в течение восстановительного периода.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма в целом от гиперпродукции свободных радикалов, содержащей пероксиредоксин или пероксиредоксин и дигидролипоевую кислоту отдельно или совместно с терапевтическим агентом и/или фармацевтическим носителем.

Перечень фигур

Фиг.1. Локализация Ргх VI в разных тканях организма. Иммуно-блотинг водорастворимых белков разных тканей крысы. Где: 1 – очищенный Ргх VI; 2-

обонятельный эпителий, 3 – легкое, 4 – трахея, 5 – мозг, 6 – матка, 7 – печень, 8 – почка, 9 – мышица, 10 – кожа.

Фиг.2. Локализация Prx VI в легких человека. Стрелка показывает локализацию пероксиредоксина.

Фиг.3. Включение ^3H -тимицина в стимулированные конканавалином А лимфоциты мыши в присутствие Prx VI. Где: 1 – среда, 2 – Т-клетки без стимуляции конканавалином А, 3 – Т-клетки, стимулированные конканавалином А, 4 – Т – клетки в присутствии Prx VI, 5 – Т-клетки стимулированные конканавалином А в присутствии Prx VI.

Фиг.4. Влияние Prx VI на спектральные характеристики облученного оксигемоглобина. Где: 1- оксигемоглобин; 2 – оксигемоглобин после гамма-облучения в присутствии 50 мкг/мл Prx VI; 3 – оксигемоглобин после гамма-облучения в присутствии 10 мкг/мл Prx VI; 4 – оксигемоглобин после гамма-облучения. Видно, что при концентрации 50 мкг/мл Prx VI полностью предотвращает превращение оксигемоглобина в метгемоглобин

Фиг.5. Внешний вид крыс через 12 месяцев после гамма-облучения (600 рентген). Где: А – контроль; В – крыса с введенным перед облучением TNF- α ; С - крыса с введенным перед облучением Prx VI.

Фиг.6. Эпителий трахеи крысы после ожога парами соляной кислоты и последующей аппликации натурального крысиного или рекомбинантного человеческого Prx VI. Аппликация проводилась через 1 час после ожога. Где: А – контроль; В – эпителий через сутки после химического ожога; С – эпителий через сутки после химического ожога с аппликацией Prx VI через час после ожога; Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана. Наблюдается практически полное сохранение всех клеток эпителия

Фиг.7. Восстановленный клеточный эпителий трахеи крысы через 14 дней после ожога парами соляной кислоты. Где: А – контроль; В – эпителий через сутки после химического ожога; С – эпителий через 14 суток после химического ожога с аппликацией Ртх VI , Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана, F- фагоциты. Терапию проводили через сутки после ожога в течение 5 дней. Аппликацию раствора фармацевтической композиции на основе рекомбинантного человеческого Ртх VI проводили один раз в сутки.

Фиг.8. Эпителий трахеи крысы после аппликации липополисахарида. Где: А - норма; В - через час после аппликации; С – через 3 часа после аппликации; Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана; F – фагоциты. Наблюдается значительная гибель клеток эпителия и появление большого количества фагоцитирующих клеток.

Фиг.9. Эпителий трахеи крысы после аппликации в нее липополисахарида и последующей аппликации рекомбинантного человеческого Ртх VI. Где: Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана; F – фагоциты. Аппликация Ртх VI проводилась сразу после аппликации липополисахарида.

Фиг.10. Эффект аппликации Ртх VI на рану. Где: А - контроль, В – крыса, которой проведена аппликация Ртх VI на рану.

Фиг. 11. Сравнительные характеристики антиоксидантных свойств дитиотреитола, липоевой кислоты и дегидролипоевой кислоты. Антиоксидантная активность определялась по степени защиты глутаминсингтетазы против металл-катализируемой окислительной системы. Антиоксидантная эффективность тиолов определялась в молярной концентрации, при которой происходила 50% защита глутаминсингтетазы.

- дитиотреитол;	- дегидролипоева кислота,	- липоевая кислота.
-----------------	---------------------------	---------------------

Описание изобретения

На основании гомологии аминокислотных последовательностей и иммунологического сродства все известные к настоящему времени пероксидоксины

млекопитающих могут быть классифицированы в следующие группы: Prx I – Prx IV, Prx V и Prx VI. Гомология белков, относящихся к одной и той же группе, составляет более 90%. Пероксидоксины Prx I – Prx V принадлежат к группе 2-Cys тиол-специфических антиоксидантов. Группа Prx VI, самая малочисленная, представлена 1-Cys пероксидоксинами, сильно отличается от других групп и имеет только 20-40% общих аминокислотных последовательностей с пероксидоксинами других групп.

Семейство пероксидоксинов отличается высокой консервативностью и его представители обнаружены в геномах практически всех живых организмов от бактерий до человека. Согласно данным иммуно-гистохимических исследований, полученных с помощью световой микроскопии и *in situ* гибридизации, пероксидоксин Prx VI обнаруживается практически во всех тканях животного (фиг.1). Однако его максимальная концентрация выявлена преимущественно в тканях непосредственно контактирующих с атмосферой, а именно: в обонятельном эпителии, трахее, бронхах легких, эпидермисе кожи и волоссяных фоликулах. На фиг.2 представлена фотография с изображением локализации Prx VI в легких человека, где темные зоны представляют максимум концентрации Prx VI (Novoselov S.V et al., 1999). Иммуно-гистохимические исследования с помощью электронной микроскопии показали, что Prx VI является единственным идентифицированным к настоящему времени секреторным пероксидоксином. Он синтезируется в специализированных клетках (бокаловидные клетки респираторного эпителия и опорные клетки обонятельного эпителия) и секretируется в слизь, покрывающей клетки этих эпителиальных тканей. Прямыми биохимическими и иммунологическими исследованиями на крысе было показано, что в трахее, бронхах легких и обонятельном эпителии вклад 28-кДа Prx VI в нейтрализацию активных форм кислорода составляет 70-80%. Аналогичные результаты были получены для трахеи и бронхов человека.

Например, в составе слизи эпителия трахеи концентрация Prx VI составляет не менее 15мкг/мг белка.

Известны способы получения натурального и рекомбинантного пероксиродоксинов. В рамках настоящего изобретения натуральный Prx VI выделяли из органов млекопитающих (Pesenko I.V. et al., 1998). Рекомбинантный белок можно получить, используя различные экспрессионные системы (Sang W. K. et al., 1998; Chen J.W. et al., 2000; Peshenko I.V. et al., 2001). Варианты получения натурального и рекомбинантного Prx VI, с помощью известных способов, приведены в разделе материалы и способы (пример 1- 2).

Первичная структура Prx VI крысы (Андреева С.Г. и др., 1998) содержит 223 аминокислоты с рассчитанной молекулярной массой 24630 Да. (EMBL/GenBank, Y17295). Ген, кодирующий Prx VI человека (Nagase T. et al., 1995), выделен из клеток миелобласта (EMB/GenBank D1 4662). По данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, молекулярный вес определен как 28 кДа.

Синтезированный рекомбинантный Prx VI (см. пример 2) сравнивают с натуральным Prx VI крысы, который выделяют из обонятельного эпителия крысы линии Вистар (см. пример 1).

Результаты испытаний (см. пример 3) показали, что рекомбинантный Prx VI имеет антиоксидантные характеристики, близкие характеристикам Prx VI, который выделен из обонятельного эпителия крысы.

Пероксиродоксин типа Prx VI входит, но не ограничивает, перечень пероксиродоксинов, которые обладают высокой антиоксидантной активностью и могут быть использованы для создания лекарственных препаратов.

Цитотоксичность натурального и рекомбинантного пероксиродоксинов определяют по влиянию 1-Cys пероксиродоксина на уровень пролиферации клеток линии L929 лимфобластомы человека и Т-лимфоцитов из селезенки мышей линии NRRI

стимулированных конканавалином А (см. пример 4). Как натуральный крысиный, так и рекомбинантный человеческий 1-Cys пероксиредоксины не оказывали никакого влияния на количество живых клеток линии L929, а уровень пролиферации Т-лимфоцитов стимулированных конканавалином А увеличивался примерно в 2 раза по сравнению с уровнем пролиферации клеток стимулированных только конканавалином А (см. фиг.3). Таким образом, можно сделать вывод о том, что тестированные соединения являются малотоксичными.

Эффективность распределения пероксиредоксина Prx VI в различных тканях организма исследуют на примере внутривенного введения композиции, в состав которой включают рекомбинантный человеческий пероксиредоксин Prx VI, меченный флуоресценциотиоцианатом (см. пример 6).

Через 15 минут после инъекции в вену композиции с пероксиредоксином Prx VI в организм млекопитающего, последний равномерно распределяется по всем органам крысы, включая мозг. Таким образом, способ внутривенного введения пероксиредоксина Prx VI позволяет повысить его содержание практически во всех тканях организма.

Многофункциональность применения пероксиредоксина, как эффективного антиоксиданта, подтверждена примерами лечения заболеваний млекопитающих вызванных как экзогенными, так и эндогенными факторами, входящими в группу: а) ионизирующей радиации, б) химического ожога, в) острого воспалительного процесса, г) раны. Приведенные примеры включают, но не ограничивают других применений пероксиредоксина для профилактики и/или лечения.

Радиопротекторные свойства пероксиредоксинов

Известно, что содержание Prx VI в клетках можно повысить за счет увеличения концентрации TNF- α в организме животного. Согласно литературным данным TNF- α активирует экспрессию некоторых пероксиредоксинов в клетках (McGonigle S. et al.,

1998). Для выяснения вопроса о том, какую роль играет синтез эндогенного пероксиредоксина внутри клетки на протекторную функцию, исследуют защитные функции организма крысы при предварительной стимуляции синтеза эндогенного пероксиредоксина в клетках животного за счет введения цитокинов до начала облучения.

Эксперимент (см. пример 7) показывает, что после воздействия летальной дозы облучения, клеточные возможности синтеза антиоксидантных ферментов ограничены и их концентрации не хватает даже при предварительной стимуляции клеточного синтеза пероксиредоксина.

Для определения роли пероксиредоксина в возможности защиты от облучения биомакромолекул (см. пример 8), например, входящих в состав внеклеточной жидкости, используют раствор гемоглобина. Облучение раствора гемоглобина приводит к существенным изменениям в структуре гемоглобина (появление пиков при 635 нм и повышение светорассеивания, фиг. 4), что свидетельствует о превращении оксигемоглобина в метгемоглобин с последующей его агрегацией.

Добавление Prx VI в раствор гемоглобина в концентрации около 50 мкг/мл до облучения приводит к значительному снижению образования окисленных форм гемоглобина, концентрация которых снижалась практически до нуля.

Радиопротекторные свойства пероксиредоксина определяют на примере защиты животного от действия гамма-облучения в сублетальной дозе с интенсивностью 6 Гр.

Данные, подтверждающие радиопротекторные свойства пероксиредоксина Prx VI, приведены в примере 1, таблице 1 и на фиг. 5. Прямая однократная инъекция рекомбинантного человеческого пероксиредоксина Prx VI в вену за 30 минут до облучения позволила резко увеличить число выживших животных по сравнению с контролем и уменьшить количество возникающих от облучения злокачественных образований.

Таблица 1. Выживаемость крыс при введении до облучения TNF- α или пероксиродоксина Prx VI. Группы по шесть крыс одновременно подвергались гамма-облучению при дозе 6 Гр. В таблице указано число выживших крыс в каждой группе в указанное время

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	15 месяцев
Контроль	4	3	2	1
TNF- α	3	2	1	-
Пероксиродоксин Prx VI	6	5	4	4

Пероксиродоксин как радиопротектор, можно использовать в качестве компонента лекарств и фармацевтических композиций для профилактики или лечения широкого спектра заболеваний. Эти заболевания могут быть вызваны: а) ионизирующей радиацией (в первую очередь при радиотерапии, профилактических исследованиях, при работе персонала с источниками радиации), б) космической радиацией, влияющей в первую очередь на космонавтов и пилотов, в) радионуклеотидным заражением из-за приема зараженной радионуклеотидами пищи, воды или воздуха, г) воздействием неионизирующей радиации, например, при томографическом исследовании, д) воздействием на организм источников ультрафиолетового излучения (солнечный свет, сварка, импульсные источники света, дисплеи). Для предотвращения или снижения действия гиперпродукции свободных радикалов возможно применение антидотов с введенными в них пероксиродоксинами. Состав антидотов должен быть ориентирован на тот тип экзогенного воздействия, который существует в зоне, в которой необходимо осуществлять работы по ремонту оборудования, или устранения аварий, или устранения последствий катастроф.

Антиоксидантные свойства пероксиродоксина и лечение воспалительных процессов

Лечение воспалительных процессов вызванных экзогенными факторами

В качестве примера экзогенного фактора был выбран химический ожог, действие которого было смоделировано в соответствии с примером 11. Для разработки более эффективного способа лечения исследовали этапы развития патологии после воздействия ожога.

На первом этапе исследовали динамику изменения уровня нейтрофилов и ферментов-антиоксидантов в клеточном эпителии трахеи крыс после ожога парами соляной кислоты. Наблюдали два периода резкого возрастания количества активных нейтрофилов: через 40 минут и 6 часов после ожога. Резкое повышение количества активных нейтрофилов усугубляет степень поражения, так как происходит выброс перекиси водорода нейтрофилами.

Биохимические исследования (см. пример 9) показали, что уровень активности 1-Cys пероксиродоксина в клетках эпителия увеличивается примерно в два раза сразу после ожога. В тоже время, активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, которые являются основными ферментами-антиоксидантами организма, уменьшается в слизи трахеи примерно на 30%. Через сутки наблюдали снижение уровня активности всех перечисленных ферментов, в том числе и 1-Cys пероксиродоксина.

Гистохимические исследования (см. пример 10) показали, что через 40 минут после ожога в эпителии трахеи и бронхах начинаются процессы гибели клеток цилиарного эпителия, которые в последующее время носят лавинообразный характер. Максимум гибели клеток эпителия слизистой верхних дыхательных путей наблюдается через сутки после ожога. При этом происходит практически полная гибель клеток мерцательного эпителия, осуществляющего мукоцилиарный транспорт в трахее и

бронхах. Это состоящие эпителия было принято в качестве контроля для сравнительной оценки степени ожога и эффективности проводимого лечения.

Без лечения частичное восстановление эпителия слизистой трахеи после химического ожога наблюдается через 30 дней.

Воспалительный процесс, вызванный химическим ожогом, характеризуется двумя периодами развития патологии после химического ожога: первый (до 24 часов после ожога) – период развития поражения эпителия, второй (после первых суток после ожога) – период очень медленного восстановления эпителия.

В качестве одного из вариантов лечения млекопитающих после химического ожога был использован вариант аппликации верхних дыхательных путей крысы раствором пероксиредоксина (см. в пример 2). На фиг. 7 показан срез эпителия трахеи крысы через 14 суток после ожога при ежедневной 5-ти кратной аппликации пероксиредоксина. Наблюдается практически полностью сохраненный эпителий слизистой трахеи, что свидетельствует о практически полной регенерации мерцательных клеток эпителия. Присутствие элементов слизистого секрета, в котором определяются фагоциты, свидетельствует о наличие остаточного воспалительного процесса в трахее.

Лечение воспалительных процессов вызванных эндогенными факторами

В качестве другой модели воспаления исследован воспалительный процесс в респираторном эпителии, вызванный токсинами бактериальной природы – липополисахаридами (ЛПС), который является составной частью внешней стенки мембранны большинства грам-отрицательных бактерий (см. пример 12).

После аппликации липополисахарида, вызывающего острую воспалительную реакцию в трахее, исследовали динамику изменения уровня нейтрофилов, TNF- α и пероксиредоксина Ргх VI в клеточном эпителии трахеи крыс. Для определения характеристик способа лечения проводили исследование динамики уровня

нейтрофилов и антиоксидантов, а также биохимические и гистохимические исследования воздействия воспалительного процесса на организм млекопитающего.

Наблюдали резкое возрастание количества активных нейтрофилов через час после введения ЛПС. Резкое повышение количества активных нейтрофилов в свою очередь усугубляет степень поражения, так как происходит выброс H_2O_2 нейтрофилами.

Биохимические исследования (см. пример 9) показали, что уровень активности пероксиреодоксина Ptx VI в клетках эпителия увеличивается примерно в два раза через час после аппликации липополисахарида.

Гистологические исследования (см. пример 10) показали, что в случае применения концентрации ЛПС равной 10^{-7} мг/животное, отмечалась массивное накопление нейтрофилов в стенке трахеи, развитие отека с последующим отслоением слизистой в просвет трахеи и гибелью клеток через 3 часа (см. фиг.8).

Иммуно-гистохимические исследования показали, что во многих областях эпителия трахеи уже через час наблюдается массовая гибель клеток, секретирующих пероксиреодоксин Ptx VI, что приводило к отсутствию пероксиреодоксина Ptx VI в слизи, покрывающей данные области трахеи. Это состояние эпителия было принято в качестве контроля для сравнительной оценки степени воспалительной реакции и эффективности проводимого лечения.

Прямая однократная аппликация человеческого пероксиреодоксина Ptx VI в трахею крысы сразу после аппликации липополисахарида приводила к практически к полному восстановлению эпителиальной ткани (через 2 недели), в то время как у животных контрольной группы, не получивших лечения после аппликации ЛПС, мерцательный эпителий практически не восстановился (см. пример 3, фиг.8).

Введение пероксиреодоксина в область поражения эпителиальных клеток предупреждает развитие вторичных альтеративных нарушений, тем самым ограничивая объем патологических изменений. Нейтрализация активных форм

кислорода восстанавливает пролиферативные клеточные процессы, способствует быстрой регенерации поврежденного эпителия, уменьшает риск развития инфекционных осложнений в очаге поражения.

Применение других антиоксидантов, например глутатиона, не дало значительного эффекта (см. таблицу 1).

Таблица 1. Сохранность эпителия трахеи при аппликации различных антиоксидантов после поражения эпителия трахеи (согласно гистологическим данным).

Время после воздействия LPS		Глутатион	Prx VI
1 час	30	30%	90%
3 часа	20	20%	80%
6 часов	10	10%	65%
Лечение через сутки в течение 5 дней и сохранность эпителия через 2 недели	20	20%	80%

При лечении ран (см. пример 4), возможно использовать разные способы введения композиции, содержащей пероксиредоксин, в межклеточное пространство области поражения. Тем не менее, даже обычное нанесение композиции тонким слоем и/или аппликация на место поражения и пассивная диффузия молекул пероксипедоксина в межклеточное пространство, приводит к более быстрому и полному заживлению раны. На фиг. 10 представлен эффект ипликации пероксиредоксина на рану.

Способ профилактики или лечения болезней при которых полезно компенсировать гиперпродукцию свободных радикалов (форм кислорода) вызываемую экзогенными и эндогенными факторами

В процессе экспериментов по моделированию экзогенных и эндогенных воздействий на организм животных, обнаружен факт того, что, введение в жидкостную среду организма (включая кровь и лимфу) и/или межклеточное пространство, тканей, органов или организма в целом водорастворимого антиоксиданта пероксиредоксина или пероксиредоксина и активатора приводит к высокой эффективности профилактики и/или лечения большой группы заболеваний которым сопутствует гиперпродукция свободных радикалов.

В общем случае, способ лечения болезней, при которых полезно компенсировать гиперпродукцию свободных радикалов в тканях или органах или во всем организме млекопитающих, заключается в введении эффективного количества по крайней мере одного типа биологически активного пероксиредоксина входящего в группу Ptx1 – PtxVI, или пероксиредоксина входящего в группу Ptx1 – PtxVI и активатора в межклеточное пространство тканей, органов или в организм млекопитающего в целом, путем аппликации, инъекции или других способов известных в практике применения биологически активных пептидов.

Предлагаемый способ относится к разным вариантам профилактики или лечения тканей, органов или всего организма млекопитающих в целом включая:

А) профилактическую защиту организма, отдельных органов и отдельных зон нормальной ткани от гиперпродукции свободных радикалов вызываемой: i) ионизирующей радиацией, например при проведении лечения рака, или при полетах на больших высотах и в космическом пространстве, ii) действием термического и/или химического ожогов при ликвидации катастроф и пожаров, iii) комбинацией факторов по п. i), ii).

Б) защиту тканей, органов и организма млекопитающих, в которых за счет эндогенных или экзогенных факторов идет воспалительный и/или иммунный процесс, связанный с гиперпродукцией свободных радикалов, что сопутствует или вносит основной вклад в процесс болезней легких, печени, почек, желудочно-кишечного тракта, иммунной системы, нервной системы, болезни глаз, воспалительных процессов, вызванных бактериальной или вирусной инфекциями, или защиту клеток организма при предотвращении последствий химиотерапии при лечении рака, лейкоза, СПИДА, или защиту от действия озона или других экзогенных факторов.

В) защиту органов, предназначенных для трансплантации или для улучшения возможности криоконсервации.

Д) защиту органов от воспалительных процессов, вызванных механическими повреждениями кожи и ткани в результате травм, инъекций лекарственных препаратов или хирургических операций.

В зависимости от вида терапии или профилактики определяют длительность применения и дозовые характеристики лекарственных препаратов содержащих пероксиредоксины. В процессе симптоматической терапии, вызванной каплем или зудом, достаточно применение одноразовых доз. Патогенетическая терапия, направленная на подавление механизмов болезни, требует применения препаратов подавляющих гиперпродукцию радикалов в процессе лечения болезни. Когда окислительно-восстановительный баланс в организме млекопитающего нарушен из-за болезни конкретного органа, требуется заместительная терапия и лечение требует доз антиоксидантов – пероксиредоксинов достаточных для компенсации и восстановления функций органа. В процессе этиотропной терапии, ввод лекарств содержащих пероксиредоксин, например через капельницу, осуществляют в течение периода вывода из организма ядов или других экзогенных веществ. Наиболее предпочтительно применение композиций и лекарств, содержащих пероксиредоксин, для проведения

комплексных терапий. В последнее время, в связи с широким распространением сердечно-сосудистых заболеваний, иммунной системы, лечением СПИД, алкогольной и наркологической зависимости препараты на основе пероксиредоксина можно использовать в поддерживающей терапии, наряду с другими препаратами длительного применения.

На основании исследования состояния ткани, органа или всего организма в целом определяют процедуру лечения, выбираемую из группы: а) однократной или многократной аппликации или распыления раствора фармацевтической композиции или лекарства на пораженный участок, б) однократных или многократных инъекций раствора фармацевтической композиции или лекарства, в) однократного или многократного приема таблетированных, порошковых или жидких форм сублингвально, или в виде присыпок, паст, свечей, мазей, гелей для нанесения на поверхность кожи и эпителия, или за счет комбинации указанных способов.

Перенос активного компонента пероксиредоксина в межклеточное пространство ткани, органа или организма в целом осуществляют либо посредством пассивной или активной диффузии при аппликациях или распылении, либо за счет переноса пероксиредоксина или пероксиредоксина и активатора через кровь или в комбинации с компонентами крови (плазма, сыворотка) или в комбинации с заместителями крови (например перфтораном) или через лимфу.

Ввод композиции в межклеточное пространство ткани, органа или организма может быть осуществлен различными способами. Поскольку пероксиредоксин подвержен расщеплению и потере биологической активности при прохождении через желудочно-кишечный тракт, основным способом введения является парентральный метод. При парентральном введении используют инъекции, инфузии, ингаляции, введение в дренаж. Раствор для инъекций вводят внутримышечно, внутривенно ударными дозами или длительными инфузиями, внутриартериально, интракальвально,

интравентрикулярно, эндолюмбально. Возможно использовать раствор, порошок или таблетированные формы сублингвально. В ряде случаев требуется вагинальный и ректальный ввод препаратов. Возможно введение композиции с помощью капель в нос или глаз, или с помощью промывания или клизм.

Способы доставки композиции к месту воспаления эпителиальных тканей, приведенные в данном описании, не ограничивают применения других известных способов доставки биологически активных полипептидов к месту воспаления или поражения.

Предпочтительно перед началом лечения воспалительных процессов исследовать уровень нейтрофилов и/или концентрацию антиоксидантов в пораженных тканях или организме. На основании полученных данных выбирают процедуру лечения, выбираемую из группы однократного или многократного контакта композиции с зоной воспаления ткани или органа и периоды нанесения композиции. Исходя из тяжести воспалительного процесса, определяют минимально-эффективное количество фармацевтической композиции и проводят лечение.

Например, при лечении воспалительных процессов верхних дыхательных путей, композицию, содержащую пероксидоксин, вводят в нос и/или в трахею и/или в бронхи легкого. Для аппликации используют или раствор композиции, или предварительно раствор распыляют, превращая его в воздушно-капельную смесь, или применяют композицию, выполненную в виде сухого мелкодисперсионного порошка, или используют композицию, которая иммобилизована в мелкодисперсные гранулы или наночастицы диаметром от 0.1 nm до 7000 nm (например, Esenaliev, 2000), или композицию иммобилизуют в липосомы (например, Thibeault D.W. et al., 1991).

При лечении поражений кожи композицию наносят тонким слоем и/или делают аппликацию на место поражения. Способы доставки композиции к месту воспаления эпителиальных тканей, приведенные в данном описании, не ограничивают применения

других известных способов доставки биологически активных полипептидов к месту воспаления или поражения.

При профилактике или лечении заболеваний, связанных с ионизирующим или неионизирующим воздействием, концентрацию, по крайней мере, одного типа пероксиредоксина, выбирают в зависимости от интенсивности ионизирующего или неионизирующего воздействия, учитывая параметры млекопитающего (его вес, возраст, состояние организма). В процессе лечения или профилактики выбранный состав композиции вводят однократно или многократно до воздействия, во время воздействия или после воздействия организма с радиацией или неионизирующим излучением.

При профилактике и/или лечении гиперпродукции свободных радикалов, вызываемой одновременным действием ионизирующей радиации и/или термического и/или химического ожога и/или заражения организма радионуклеидами за счет приема с пищей, водой или воздухом, используют комбинированный способ введения пероксиредоксина за счет одновременного применения внутривенных инъекций и аппликаций на место поражения, что позволяет снизить токсикацию организма и предотвратить процесс неконтролируемой гибели клеток.

В фармацевтической композиции возможно использовать различные типы пероксиредоксинов (Prx I- Prx VI) поскольку распределение концентраций разных типов пероксиредоксинов различно в зависимости от типа ткани или органа (Knoops B. et al., 1999). Для формирования вариантов композиций предпочтительно использовать комбинацию из нескольких типов пероксиредоксинов которые имеют максимальную концентрацию для каждого конкретного органа или ткани. Возможно использовать рекомбинантные пероксиредоксины полученные из клеток растительного или животного происхождения после их отбора с помощью тестов на биологическую активность и способность вызывать аллергические реакции. Например, для лечения

воспалительных процессов в эпителиальных тканях более предпочтительно использовать рекомбинантный человеческий пероксидоксин типа Prx VI, который обладает более сильными антиоксидантными характеристиками по сравнению с I-V типами пероксидоксинов.

Для лечения воспалительных процессов минимальную концентрацию пероксидоксина Prx VI в композиции определяют, во-первых, исходя из эффективной концентрации пероксидоксина Prx VI при защите биомакромолекул от активных форм кислорода *in vitro* и, во-вторых, исходя из концентрации пероксидоксина Prx VI в ткани в норме.

В зависимости от тяжести воспалительного процесса и выбранного способа лечения концентрация пероксидоксина Prx VI в лекарственном средстве или фармацевтической композиции может выбираться от 0.01 до 10.0 мг/мл.

Например, в случае поражения органов дыхания крысы раствором липополисахарида и в случае химического ожога, эмпирически полученная концентрация пероксидоксина Prx VI составила 0.5-1.0 мг/мл при аппликации 20-50 мкл его раствора непосредственно в трахею, что соответствовало от 10 до 50 мкг пероксидоксина Prx VI на крысу. Учитывая площадь поверхности трахеи крысы, это соответствует аппликации 5-10 мкг пероксидоксина Prx VI на 1 см² пораженной ткани. Это количество пероксидоксина Prx VI может быть использовано при аппликации на пораженную ткань для любого млекопитающего, включая человека.

В случае применения пероксидоксина Prx VI в качестве радиопротектора количество пероксидоксина Prx VI, вводимого в организм перед облучением, может выбираться от 1 до 10 мг/кг веса животного и зависит от мощности излучения. В случае сублетальной дозы гамма-облучения, эмпирически полученное количество пероксидоксина Prx VI составило 2-5 мг/кг веса животного при инъекции 1 мл его

раствора в вену. Это количество пероксиродоксина Prx VI может быть использовано при введении для любого млекопитающего, включая человека.

Так как пероксиродоксин Prx VI является хорошо растворимым белком, в качестве растворителей для проведения аппликации могут быть использованы физ.раствор, раствор Рингера и другие сбалансированные солевые растворы (Dawson R.M., 1986), а также растворы на основе моно или полисахаридов, например глюкозы, и/или содержащие витамины. Эти же растворители могут быть использованы при создании композиции в воздушно-капельной форме, например в форме спрея.

При применении пероксиродоксина для лечения патологий, вызванных бактериальной флорой или иными факторами, эффективность композиции существенно возрастает при добавлении активатора пероксиродоксина, так как запасы собственных активаторов пероксиродоксина в организме ограничены. Более того, при наружном применении пероксиродоксина дефицит активатора очевиден. Классическим активатором пероксиродоксинов является дитиотрейтол (Novoselov S.V. et al., 1999). Однако ввиду его токсичности, применение его в лекарственных формах исключается. Одним из естественных активаторов пероксиродоксина VI является дигидролипоевая кислота, которая нетоксична и может быть получена восстановлением S-S связи широко используемой в медицине альфа-липоевой кислоты (1,2-дитиолан-3-пентановая кислота) (Sang W. K. et al., 1998). Дигидролипоевая кислота как активатор пероксиродоксина исследована в работе (Peshenko I.V. Shichi H., 2001) в *in vitro* экспериментах. Эффективность дигидролипоевой кислоты в качестве активатора пероксиродоксина *in vivo* продемонстрирована в примере 5.

Концентрацию дигидролипоевой кислоты в композиции выбирают в пределах от 0.01 до 10mg/ml в зависимости от концентрации пероксиродоксина (см. фиг. 11).

Использование пероксиродоксина и его естественного активатора в виде дигидролипоевой кислоты позволяет снизить концентрацию полипептида и активатора

в композиции и снизить вероятность возникновения аллергических процессов в организме.

При генерализации воспалительного процесса (например, при возникновении сепсиса) с вовлечением нескольких органов и/или систем рекомендуется в состав лекарственного средства включать антибиотики и/или глюкокортикоиды в комбинации с пероксиредоксином Рх VI или проводить комбинированную терапию.

В общем случае композиция содержит пероксиредоксин или пероксиредоксин и дигидролипоевую кислоту в качестве основного действующего вещества и фармацевтически приемлемые добавки в следующих соотношениях мас.%

- i) пероксиредоксин от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное;
- ii) пероксиредоксин и дигидролипоевая кислота в сумме от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное. Где соотношение пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте (w/w) составляет от 1 до 50.

В качестве фармацевтических добавок могут быть использованы моно или полисахариды, аминокислоты, низкомолекулярные белки используемые для стабилизации и последующей лиофилизации композиции.

Фармацевтическая композиция, выполненная в форме раствора для внутреннего введения содержит от 0,01 до 0,5%, предпочтительно от 0,01 до 0,1%, основного действующего вещества, в форме для обработки раневых поверхностей или в форме мази или суппозитариев для ректального или интравагинального введения содержит от 0,1 до 1,0% основного действующего вещества, в форме раствора для глазных капель содержит от 0,1 до 0,3% основного действующего вещества.

При создании жидких сред используют растворитель, выбираемый из группы: а) сбалансированного солевого раствора, б) сбалансированного солевого раствора и активатора пероксиредоксина в концентрации от 0,001% до 1,0 % (w/w).

При создании лиофилизированных форм используют моно и/или полисахариды, которые известны для стабилизации биологически активных полипептидов для фармакологии. Лиофилизированные формы могут быть использованы для приготовления порошков выбираемых из группы: порошок для приготовления инъекционных, инфузионных растворов, порошок для ингаляций, порошок для применения в мазях, гелях, сусpenзиях, порошок для приготовления таблетированных форм.

Концентрация пероксиредоксина в составе порошка составляет от 0,1% до 90%. В таблетированной форме, которую используют сублингвально, концентрация пероксиредоксина может составлять от 0,01% до 1,0%.

Возможно применение комплексного лечения, когда композицию, включающую пероксиредоксин или пероксиредоксин и активатор применяют совместно или предварительно или после применения, по крайней мере, одного терапевтического агента широкого спектра действия.

Терапевтический агент выбирают из группы состоящей из: i) антибактериальных, антивирусных, антигрибных, антигистаминных препаратов, ii) высокомолекулярных ферментов, которые обеспечивают дополнительную защиту от свободных радикалов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), iii) низкомолекулярных соединений, обеспечивающих дополнительное снижение уровня свободных радикалов внутри клетки (токоферол глутатион, убихинон), iv) препаратов используемых для трансплантации или криоконсервации органов, v) биологически активных белков, например инсулина, vi) гормонов, vii) витаминов, viii) цитокинов.

Терапевтический агент, применяемый совместно с пероксиредоксином, не должен ингибировать биологическую активность пероксиредоксина как фермента.

Представленные формы композиции и способы ее применения не ограничивают других вариантов, которые известны из области медицины или ветеринарии при

применении антиоксидантной терапии. Вариации, вытекающие из данного изобретения и очевидные каждому специалисту, имеющему средний уровень знаний в данной области, должны рассматриваться в рамках предполагаемого изобретения.

1. Материалы и способы для получения пероксиредоксина и исследования его свойств.

Известно несколько способов получения пероксиредоксинов. В рамках настоящего изобретения пероксиредоксин выделяли из органов млекопитающих (Pesenko I.V et al. 1998), или получали рекомбинантный белок, используя различные экспрессионные системы (Sang Won Kang et al. 1998, Chen J.W. et al. 2000).

Пример 1. Получение натурального 1-Cys пероксиредоксина крысы

Получение натурального 1-Cys пероксиредоксина крысы проводили по следующей процедуре. Натуральный 1-Cys пероксиредоксин крысы выделяли из обонятельного эпителия крысы линии Вистар, который содержит максимальное количество этого белка. Изолированный обонятельный эпителий дважды промывали в физиологическом растворе и гомогенизировали в нем же. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 500g, супернатант повторно дважды центрифугировали при 20000g и диализовали в течение 12 часов против раствора А в состав которого входит: 12 mM Трис/HCl, pH 7.8, 1 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитола. После диализа экстракт наносили на хроматографическую колонку (305 x 12.5 мм), заполненную гелем ДЭАЭ-сепарозой (DEAE-Sepharose, Pharmacia) и предварительно уравновешенную раствором А. Белки элюировали при линейном изменении градиента NaCl от 0 mM до 500 mM в растворе А при 17°C. Объем раствора составлял 750 мл, скорость элюции 0.7 мл/мин. Фракции анализировали по антиоксидантной активности. Фракции, содержащие 1-Cys пероксиредоксин, концентрировали и затем хроматографировали на колонке, заполненной гелем Sephadryl S-200 (820x16 мм). Колонку элюировали буфером Б: 25 mM Трис/HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM дитиотреитол. Скорость

элюции - 0.6 мл/мин, при t^0 - 40°C. Фракции, содержащие 1-Cys пероксиредоксин, собирали, концентрировали, диализовали против физиологического раствора и использовали в дальнейших экспериментах.

Пример 2. Получение человеческого рекомбинантного 1-Cys пероксиредоксина

Человеческий рекомбинантный 1-Cys пероксиредоксин получали следующим образом. Комплементарная ДНК, кодирующая человеческий 1-Cys пероксиредоксин, была выделена из клона НА0683 (Nagase T. et al., 1995) (GenBank, D14662) известными методами. Затем ДНК была клонирована в экспрессионную плазмиду pET-23a (+) фирмы Novagen по сайтам рестрикции NdeI и EcoRI, с помощью рестрикционных ферментов фирмы MBI Fermentas. Полученную плазмиду использовали для трансформации клеток E.coli (штамм BL 21 (DE3), из библиотеки штаммов ИБФМ РАН) для получения рекомбинантного человеческого 1-Cys пероксиредоксина. Клетки E.coli, экспрессирующие пероксиредоксин, разрушали ультразвуком на генераторе УЗДН-2 при частоте 22 кГц в течение пяти минут при 0°C. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 500g, супернатант повторно дважды центрифугировали при 20000g и диализовали в течение 12 часов против раствора А (см. пример 2). Рекомбинантный 1-Cys пероксиредоксин выделяли по методу выделения натурального крысиного 1-Cys пероксиредоксина (см. пример 1).

Пример 3. Сравнительные характеристики крысиного натурального и человеческого рекомбинантного натурального пероксиредоксинов Prx VI.

Рекомбинантный человеческий пероксиредоксин Prx VI (GenBank, D14662) сравнивают по фактору антиоксидантной активности с натуральным крысиным пероксиредоксином Prx VI (EMBL/GenBank, Y17295). Для определения активности пероксиредоксина Prx VI используют его способность защищать глутаминсингтетазу против ДТТ/Fe⁺³/O₂ окислительной системы. Инкубационную смесь объемом 60 мкл, которая содержит 5 мкг глутаминсингтетазы, 3 мМ ДТТ, 3 мкМ Fe⁺³, 50 мМ HEPES, pH

7.3, инкубируют 10 мин при 37° С. В качестве активатора 1-Cys пероксидоксина используют дигидролипоевую кислоту в концентрации 3 мМ. Остаточную активность глутаминсинтетазы определяют приливанием к пробе 200 мкл реакционной смеси, которая содержит: АДФ- 0.4 мМ, глутамин - 150 мМ, K-AsO₄ - 10 мМ, NH₂OH - 20 мМ, MnCl₂ - 0.4 мМ, HEPES - 100 мМ pH 7.4. После инкубации в течение 10 мин при 37° С, к пробе приливают 100 мкл красителя. В состав красителя входит: 5,5 г FeCl₃·6 H₂O, 2 г ТХУ, 2.1 мл конц. HCl (38%) на 100 мл H₂O. Степень активности пероксидоксина определяют по значению концентрации белка, при которой наблюдалось 50% сохранение активности глутаминсинтетазы. Рекомбинантный пероксидоксин Ртх VI имеет антиоксидантные характеристики, близкие к натуральному крысиному пероксидоксину Ртх VI. В дальнейшем человеческий рекомбинантный пероксидоксин Ртх VI используют для отработки способов лечения или в качестве компонента фармацевтических композиций..

Пример 4. Определение цитотоксичности пероксидоксинов

Цитотоксичность пероксидоксинов определяют по влиянию 1-Cys пероксидоксинов на уровень пролиферации клеток линии L929 лимфобластомы человека и Т-лимфоцитов из селезенки мышей линии NRRI стимулированных конканавалином А.

Клетки двух линий с концентрацией 10⁴ клеток/мл среды культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 5% бычьей эмбриональной сыворотки. Стимуляцию Т-лимфоцитов проводили при концентрации конканавалина А 0.1 мкг/мл. В случае Т-лимфоцитов уровень пролиферации определяли по включению ³Н-тимидина. Количество живых клеток линии L929 определяли в 96-луночной плашке с помощью красителя тринанового с последующим сканированием на многоканальном фотометре Мультискан (LKB, Швеция).

Натуральный крысиный и рекомбинантный человеческий 1-Cys пероксиреодоксины (в концентрации 0.1-10 мг/мл) не оказали никакого влияния на количество живых клеток линии L929.

В случае Т-лимфоцитов, стимулированных конканавалином А, уровень пролиферации клеток увеличивался примерно в 2 раза в присутствии натурального крысиного или рекомбинантного человеческого 1-Cys пероксиреодоксина (в концентрации 0.1-1.0 мг/мл) по сравнению с просто стимулированными конканавалином А клетками.

Пример 5. Сравнительные характеристики активаторов пероксиреодоксина VI.

Для определения эффективности активации пероксиреодоксина VI дитиотреитолом и дигидролипоевой кислотой (натуральный активатор) использовалась способность пероксиреодоксина VI защищать глутаминсингтазу от инактивации, вызванной металл-катализируемой окислительной системой. Инкубационная смесь объемом 60 мкл содержала 5 мкг глутаминсингтазы, 50 мкг пероксиреодоксина VI, 3 мМ аскорбиновой кислоты, 3 мкМ Fe^{+3} , 50 мМ HEPES, pH 7.3 и дитиотреитол или дигидролипоевая кислота разных концентраций, инкубировалась 10 мин при 37° С. Остаточную активность глутаминсингтазы определяли приливанием к пробе 200 мкл реакционной смеси (АДФ- 0.4 мМ, глутамин - 150 мМ, K-AsO₄ - 10 мМ, NH₂OH - 20 мМ, MnCl₂ - 0.4 мМ, HEPES - 100 мМ, pH 7.4). После инкубации в течение 10 мин при 37° С, к пробе приливали 100 мкл красителя. В состав красителя входит 5,5 г FeCl₃·6 H₂O, 2 г ТХУ, 2.1 мл конц. HCl (38%) на 100 мл H₂O. Степень активности пероксиреодоксина определяли по значению концентрации белка, при которой наблюдалось 50% сохранение активности глутаминсингтазы.

На фиг.11 представлена степень защиты глутаминсингтазы в зависимости от концентрации тиолов. Как видно из графиков, антиоксидантная эффективность дигидролипоевой кислоты практически идентична дитиотреитолу.

Пример 6. Распределение пероксидоксина Prx VI в организме животного после его инъекции.

Для выявления распределения экзогенного пероксидоксина Prx VI в различных тканях организма в вену крысы вводился рекомбинантный человеческий пероксидоксин Prx VI, меченный флуоресценциоцианатом в количестве 10 мг на животное. Через определенные промежутки времени животных убивали, выделяли ткани различных органов и проводили люминесцентный анализ полученных образцов. Полученные данные показали, что через 15 минут после инъекции меченого пероксидоксина Prx VI, последний равномерно распределяется по всем органам крысы, включая мозг. Исключение составляет костный мозг, где количество экзогенного пероксидоксина Prx VI было мало по сравнению с другими тканями. Таким образом, способ введения пероксидоксина Prx VI с помощью инъекции в вену, позволяет повысить его содержание практически во всех тканях организма.

2. Материалы и способы для определения пероксидоксина в пробах и анализ свойств пероксидоксина в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

Пример 7. Протекторный эффект пероксидоксина от действия ионизирующего облучения при его гиперэкспрессии в клетке.

Крыс распределяют на две группы. Первую группу животных (n=6) используют для контроля. Животным второй группы (n=6) за 30-60 минут до облучения внутривенно вводят 0,1 мкг TNF- α (1 мл физ. раствора при концентрации TNF- α 0,1 мкг/мл). Облучение всех животных (крысы линии Вистар весом 200 гр.) проводят одновременно на установке ГУБЭ. Доза облучения составляет 6 Гр, которую считают для крыс сублетальной. После облучения животных содержат в общем помещении с достаточным количеством корма, освещением и вентиляцией. На гистологическое исследование отбирают животные из каждой группы с признаками ухудшившегося общего состояния.

Смертность животных после облучения в разных группах крыс представлены в таблице I. Как видно из таблицы, смертность крыс в контрольной группе и в группе крыс, которым был введен TNF- α , была практически одинакова. Гистологический контроль показал, что у всех крыс основной причиной смерти животных являлось опухолеобразования (опухоли печени, лимфомы в паховой области). Общее состояние выживших животных через год после облучения характеризовалось: большой потерей массы тела животных (вес 180—200 г), скудным оволосением тела, низкой двигательной активностью, наличием опухолевого процесса (фиг 5а-в). Отсутствие эффекта в случае TNF- α объясняется, по-видимому, кратковременным действием активации экспрессии пероксиредосина Prx VI в клетках, которая снижается в процессе воздействия облучения.

Пример 8. Зашита оксигемоглобина от действия ионизирующего облучения с помощью пероксиредоксина Prx VI.

Для проверки возможности защиты пероксиредоксинами биомакромолекул от деструкции, вызванной ионизирующим излучением, было исследованы характеристики облученного оксигемоглобина в контроле и в присутствии пероксиредоксина Prx VI. В контроле использовали раствор оксигемоглобина (0.16 D при 540 нм) в 0.1 М трис-НС1 (рН 7.0), который облучали в установке ГУБЕ, с общей дозой облучения — 10 Гр. В качестве радиопротектора использовали пероксиредоксин Prx VI при различных концентрациях (5-100 мкг/мл) в присутствии 50 мкМ дитиотреитола в качестве активатора пероксиредоксина. Образование окисленных форм оксигемоглобина (метгемоглобин) регистрировали при 635 нм, а агрегацию метгемоглобина регистрировали при 700 нм.

Пример 9. Определение пероксиредоксина Prx VI в биологических пробах.

Поликлональные кроличьи антитела против рекомбинантного пероксиредоксина получали стандартным способом путем двухкратной иммунизации животного рекомбинантным человеческим пероксиредоксином. Титр полученных антител по ELISA составил 1:10000, по иммуноблотингу – 1:2000. Специфичность антител проверяли иммуноблотингом с использованием водорастворимого экстракта трахеи человека и иммуногистохимическими методами, используя парафиновые срезы легких человека, которые показали высокую степень специфичности полученных антител.

Очищенные кроличьи антитела получали из сыворотки осаждением сульфатом аммония с последующей хроматографией на ДЭАЭ целлюлозе. Коньюгаты антител с пришитой пероксидазой хрена получали стандартным методом периодатного окисления по способу Вильсона и Накане с молярным соотношением иммуноглобулина к пероксидазе равным 1:3.

Титр коньюгата для человеческого пероксиредоксина составил: для ELISA 1:1000 и для иммуноблотинга и иммуногистохимии 1:500. Специфичность коньюгата соответствовала специфичности сыворотки, которая была использована для получения IgG.

Протокол иммуноферментного определения пероксиредоксина Prx VI в биологических пробах:

1. В лунки плашки заливают 200 мкл раствора иммуноглобулина G против человеческого рекомбинантного пероксиредоксина (разведение 1:1000) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.
2. Плашки промывают физраствором (3 X 5 мин) и блокируют 1% сухим молоком в течение 30 мин при комнатной температуре.
3. В лунки заливают 200 мкл исследуемых проб и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.
4. Плашки промывают физраствором, содержащим 0,1% Твин 40 (3 X 5 мин)

5. В лунки плашки заливают 200 мкл раствора конъюгата (разведение 1:500) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре
6. Плашки промывают физраствором, содержащим 0,1% Твин 40 (3 X 5 мин)
7. В лунки заливают раствор ABTS (25 мг ABTS в 25 мл цитратного буфера, pH 4,0 + 40 мкл 3% перекиси)

8. Плашки сканируют на Мультискане при 405 нм

Чувствительность системы составляет десятки нанограмм в миллилитре пробы.

Пример 10. Иммуногистохимическое выявление пероксиредоксина Prx VI в тканях человека.

Выделенную ткань фиксировали в 4% формальдегиде и 0,25% глутаральдегида на 20мМ фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl. Фиксацию проводили в течение 12 часов при 37 °C. Ткань промывали в физрастворе 4 раза в течение часа. Ткань дегидратировали последовательной проводкой через этиловый спирт с возрастающей концентрацией (40-100%). Ткань промывали раствором ксилол-спирт (1:1) в течение часа, ксилолом и ксилол-парафин (1:1) в течение 12 часов. Ткань заключали в парафин и получали 5 мк срезы на микротоме. Срезы депарафинизировали в ксилоле и уменьшающимися концентрациями спирта. Срезы промывали физраствором, блокировали 5% фетальной сывороткой, эндогенную пероксидазу ингибиравали 0,3% перекисью водорода и инкубировали с конъюгатом в течение часа, трижды промывали физраствором и окрашивали диаминобензидином (6 мг на 10 мл 50 мМ трис-НС1 буфера, pH 7,6 плюс 200 мкл 3% перекиси водорода).

На фиг 2. представлено иммуногистохимическое определение пероксиредоксина Prx VI в легких человека. Видно интенсивную концентрацию пероксиредоксина Prx VI в бронхе легких.

3. Материалы и способы для моделирования экзогенных и эндогенных факторов вызывающих гиперэкспрессию свободных форм кислорода.

Пример 11. Химический ожог верхних дыхательных путей.

Крыс аналгезировали анальгином (100 мг/кг веса) и помещали в эксикатор, насыщенный парами соляной кислоты на 10 мин (объем эксикатора – 10 литров) (всего использовано 20 животных). После химического ожога крыс выдерживали определенное время (40 мин, 6 час, 1 сутки, 2 суток, 14 суток, 30 суток), усыпляли гексеналом (300 мг/кг веса) и выделяли пробу эпителиальной ткани трахеи. Для гистохимических исследований выделенную пробу помещали в фиксирующий раствор, содержащий 2% формальдегида и 0.5% глутаральдегида. Ткань дегидратировали последовательной проводкой через этиловый спирт с возрастающей концентрацией (40-100%). Ткань заливали в смолу LR white resin. Полимеризация смолы проводилась при комнатной температуре. Срезы толщиной 0,5 мкм, получали на ультратоме LKB, Швеция, используя стеклянные ножи. Срезы окрашивались смесью гематоксилина-эозина, анализировались на световом микроскопе.

На фиг.6б показан срез эпителия трахеи крысы через сутки после ожога, на фиг.7 – через 14 дней после ожога. Максимальное разрушение эпителия наблюдается через сутки после ожога, при этом ресниччатые клетки, обеспечивающие ток слизи в трахее, практически отсутствуют. Через две недели наблюдается частичное восстановление ресниччатых клеток.

Пример 12. Эффект аппликации липополисахарида в трахею крысы.

Исследование уровня нейтрофилов в зависимости от динамики воспалительного процесса в эпителиальных клетках проверяли на группе из 4 крыс линии Вистар весом 150-200 грамм. Крыс анестезировали гексеналом и через катеттер вводили 100 мкл раствора липополисахарида (концентрация липополисахарида 10^{-9} – 10^{-11} мг/мл, всего использовано 20 животных). После аппликации липополисахарида выдерживали определенное время (1 час, 3 часа, 6 часов, 7 часов, 9 часов), усыпляли гексеналом (300 мг/кг веса) и выделяли пробу эпителиальной ткани трахеи. Для гистохимических

исследований выделенную пробу помещали в фиксирующий раствор, содержащий 2% формальдегида и 0.5% глутаральдегида. Ткань дегидратировали последовательной проводкой через этиловый спирт с возрастающей концентрацией (40-100%). Ткань заливали в смолу LR white resin. Полимеризация смолы проводилась при комнатной температуре. Срезы толщиной 0,5 мкм, получали на ультратоме LKB, Швеция, используя стеклянные ножи. Срезы окрашивались смесью гематоксилина-эозина, анализировались на световом микроскопе.

На фиг 8б показаны срезы эпителия трахеи крысы через 3 часа после аппликации липополисахарида. Наблюдаются Гистологические исследования показали, что в случае применения ЛПС 10^7 мг/животное препарата отмечалась массивное накопление нейтрофилов в стенке трахеи, развитие отека с последующим отслоением слизистой в просвет трахеи и гибелью клеток через 3 часа.

Иммуногистохимические исследования показали, что во многих областях эпителия трахеи уже через час наблюдается массовая гибель клеток, секретирующих пероксидоксин Prx VI, что приводило к отсутствию пероксидоксина Prx VI в слизи, покрывающей данные области трахеи.

Для биохимических исследований соскабливали эпителий трахеи тонким шпателем, соскоб смывали физиологическим раствором и центрифугировали при 10 000g в течение 15 мин. Концентрацию перекиси водорода определяли методом люминисценции. Динамика активностей пероксидоксина Prx VI, TNF- α и респираторный взрыв нейтрофилов после аппликации ЛПС в трахею крысы показали, что максимум секреции пероксидоксина наблюдался через час после аппликации ЛПС, в то время как максимум экспрессии TNF- α наблюдался через 3 часа и респираторный взрыв нейтрофилов через 6 часов.

4. Примеры терапевтических и протекторных свойств пероксидоксина

Предложенное описание, включает конкретные примеры реализации настоящего изобретения, которые не следует рассматривать в контексте ограничения области использования данного изобретения. Вариации, вытекающие из данного изобретения очевидные каждому специалисту, имеющему средний уровень знаний в данной области должны рассматриваться в рамках предполагаемого изобретения.

Пример 13. Протекторный эффект инъекции пероксиродоксина Ртх VI при поражающем действии ионизирующего облучения

Одновременное облучение всех животных (крысы линии Вистар весом 200 гр.) проводили на установке ГУБЭ. Доза облучения – 6 Гр. Крыс распределили на две группы. Первая группа животных (n=6) использовалась для контроля. Животным второй группы (n=6) за 30-60 минут до облучения внутривенно вводили 1 мг пероксиродоксина Ртх VI (1 мл физ. раствора при концентрации пероксиродоксина 1 мг/мл). После облучения животных содержали в общем помещении с достаточным количеством корма, освещением и вентиляцией. На гистологическое исследование отбирали животных из каждой группы с признаками ухудшившегося общего состояния.

Данные по смертности животных после облучения для разных групп крыс представлены в таблице I. Как видно из таблицы, смертность крыс, которым перед облучением был введен пероксиродоксин Ртх VI, существенно ниже, чем в контрольной группе. Общее состояние выживших животных через год после облучения существенно отличалось в пользу второй группы по сравнению с контрольной группой (фиг. 5б). У животных из первой группы, по сравнению с животными второй группы, отмечается: большая потеря массы тела (кахексия) (вес 180—200 г), скудное оволосение тела, низкая двигательная активность, наличие опухолевого процесса.

Пример 14. Терапевтические и протекторные свойства пероксиродоксина Prx VI при лечении верхних дыхательных путей крысы после химического ожога

Терапевтические свойства пероксиродоксина Prx VI при лечении верхних дыхательных путей крысы через сутки после ожога проверяли на группе из 4 крыс линии Вистар весом 150-200 грамм. Ожог проводили способом, описанным в (см. пример 11) аппликацию раствора композиции начинали через час после ожога (протекторный эффект пероксиродоксина Prx VI) или через сутки после химического ожога (время максимального разрушения эпителия слизистой трахеи, лечебный эффект пероксиродоксина Prx VI). А в последнем случае аппликацию проводили один раз в день в течение 5 дней. Крыс предварительно усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения гексенала (70 мг/кг), животных фиксировали на операционном столе и под визуальным контролем с помощью бинокулярной лупы через катетер диаметром 1 мм им вводили в трахею раствор пероксиродоксина объемом от 20 до 100 мкл. Концентрацию пероксиродоксина выбирали в пределах от 0,5 до 5,0 мг/мл. В качестве растворителя использовали 0,9 % раствор NaCl.

Гистологические исследования проводили через сутки после ожога (в случае протекторного эффекта пероксиродоксина и через 14 дней в случае лечебного эффекта пероксиродоксина. Гистохимические исследования проводили по процедуре, приведенной в примере 10.

Пример 15. Терапевтические свойства пероксиродоксина Prx VI при лечении верхних дыхательных путей крысы непосредственно после воздействия раствора ЛПС.

Терапевтические свойства пероксиродоксина Prx VI при лечении верхних дыхательных путей крысы непосредственно после аппликации ЛПС проверяли на группе из 4 крыс линии Вистар весом 150-200 грамм. Аппликацию ЛПС проводили способом описанным в примере 12. После ЛПС проводили аппликацию раствора композиции на основе пероксиродоксина Prx VI в трахею. Предварительно крыс

усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения гексенала (70 мг/кг). Животных фиксировали на операционном столе и под визуальным контролем с помощью бинокулярной лупы через катетер диаметром 1 мм им вводили в трахею раствор пероксиродоксина (20 – 100 мкл). Концентрация пероксиродоксина – 0,5-5,0 мг/мл, в качестве растворителя использовались 0,9 % NaCl. Аппликацию раствора композиции проводили однократно непосредственно после аппликации ЛПС. В качестве контроля использовалась аппликация чистого растворителя, растворы сывороточного альбумина (10 мг/мл) и глутатиона (10 мМ).

Через сутки после аппликации ЛПС проводили гистологическое исследование трахеи. Гистохимические исследования проводили способом, описанным в разделе примере 3.

На фиг.9 показан срез эпителия трахеи крысы через сутки после аппликации ЛПС с аппликацией пероксиродоксина сразу после ЛПС. Наблюдается полная сохранность эпителия. Единственное отличие от интактной трахеи состоит в том, что увеличилось количество макрофагов и тучных клеток. Как видно из фотографии наблюдалось практически полное сохранение или восстановление эпителия трахеи.

Пример 16. Лечебные свойства пероксиродоксина Рх VI при лечении ран.

Предварительно крыс усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения гексенала (70 мг/кг). Животных фиксировали на операционном столе и на наносили с помощью лезвия порезы кожи обоих лап глубиной 2-3 мм и длиной 1 см. Контрольные порезы промывали физраствором и накладывали марлевую повязку, в случае пероксиродоксина рану промывали раствором пероксиродоксина Рх VI в 0,15 M NaCl в концентрации 0,5 мг/мл и накладывали марлевую повязку, смоченную тем же раствором пероксиродоксина. Повязку меняли раз в сутки. Эффект действия пероксиродоксина представлен на фиг.10. Как видно на фотографии в случае пероксиродоксина через 5 дней наблюдается практически полное заживление раны по

сравнению с контролем. Гистологические исследования также показали существенно меньшие рубцы в случае применения пероксиродоксина Рх VI.

Промышленная применимость

Фармакологическая композиция содержащая, по крайней мере, один тип пероксиродоксина может найти профилактическое и/или лечебное применение для многих болезней, которые сопровождаются гиперпродукцией свободных радикалов.

Более высокая эффективность композиции на основе пероксиродоксина по сравнению с известными антиоксидантами позволяет повысить эффективность и сократить сроки лечения.

Фармакологическая композиция не обладает токсичностью и биосовместима с организмом млекопитающих, в том числе и человека, так как в ней в качестве основного элемента используется рекомбинантный человеческий пероксиродоксин. Низкая токсичность композиции позволяет повысить эффективность лечения за счет одновременного комбинированного воздействия на локальные области организма и весь организм в целом за счет аппликаций и внутривенного введения композиции. Это особенно важно при лечении многофакторных воздействий на организм, например, радиации, термического, химического ожогов, ран, ушибов возникающих во время катастроф и пожаров. Композиция имеет высокую растворимость и быстро проникает в межклеточное пространство организма, что позволяет лечить заболевания практически всех органов. Композиция совместима с любыми фармацевтически пригодными носителями не снижающими биологическую активность фермента.

Литература

1. Bauer V. and Bauer F.(1999) Reactive Oxygen Species as Mediators of Tissue Protection and Injury. *Gen. Physiol. Biophys.*, 18, Focus Issue, 7-14.
2. Babisch J.G., Howell T. Compositions containing carotenoids and tocotrienols and having synergistic antioxidant effect. PCT appl. WO0230419 (2002-04-18)

3. Gillissen A. and Nowak D. (1998) Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir Med* , 92(4):609-623.
4. Kelly F.J. (1999) Gluthathione: in defence of lung. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10): 963-6.
5. Tabot O., Eliot T. Composition and method for enhancing wound healing. US Pat. 6,187,743 (13.02.2001)
6. McLean L.R. et al. Synthetic lung surfactant having antioxidant properties. US Pat. 5,683,982 (04.11.1997)
7. White K., Kumuda C. Use of thioredoxin-like molecules for induction of MnSOD to treat oxidative damage. US Pat. 5,985,261 (16.11.1999)
8. Davis J.M., Rosenfeld W.N., Sanders R.J. and Gonenne A. (1993) Prophylactic effects of recombinant human superoxide dismutase in neonatal lung injury. *J.Appl. Physiol.*, 74:2234-2241.
9. Hellstrand, K. et al. Treatment and prevention of reactive oxygen metabolite-mediated cellular damage. US Patent Appl. 20010023256 (20.09.2001)
10. Vita J.A. et al. Methods of treating vascular diseases characterized by nitric oxide insufficiency PCT appl. WO0135961 (25.05.2001).
11. Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G., and Rhee S.G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91, pp.7017-7021.
12. McGonigle S., Dalton J. P., and James E.R. (1998) Peroxidoxins: a new antioxidant family. *Parasitology Today*. 14,139-145.
13. Prosperi M.T., Ferbus D., Rouillard D., and Goubin G. (1993) A human cDNA corresponding to a gene over expressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 11050-11056,

14. Pesenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Ju.V., Kamzalov S.S., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1998) Identification of a 28 kDa secretory protein from rat olfactory epithelium as a thiol-specific antioxidant. *Free Rad.Biol.Med.*, 25, 654-659.

15. Novoselov S.V., Peshenko I.V., Popov V.V., Novoselov V.I., Bystrova M.F., Evdokimov V.A., Kamzalov S.S., Merkulova M.I., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1999) Localization of the 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties. *Cell.Tissue.Res.* 298, 471-480.

16. Butterfield L.H. From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* 1999 Winter;1(4):385-402.

17. Chung YM, Yoo YD, Park JK, Kim YT, Kim HJ. Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin. *Anticancer Res* 2001 Mar-Apr; 21(2A):1129-33

18. Kinnula V.L. et al. Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002 Mar;196(3):316-23

19. Kim S.H. et al. Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 2001;(61):223-35.

20. Das K.C. et al. Induction of peroxiredoxin gene expression by oxygen in lungs of newborn primates. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 Aug; 25(2):226-32.

21. Kim H.S. et al. Regulation of 1-cys peroxiredoxin expression in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002 Aug; 27(2): 227-33.

22. Fujii T. Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. *Eur J Biochem* 2001 Jan; 268(2):218-25

23. Lee SC. et al. Peroxiredoxin is ubiquitously expressed in rat skin: isotype-specific expression in the epidermis and hair follicle. *J Invest Dermatol* 2000 Dec; 115(6):1108-14.

24. Park S.H. et al. Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res* 2000 Dec;6(12):4915-20.

25. Chandrashekhar R., Tsuji N. *Dirofilaria* and *brugia* thioredoxin peroxidase type-2 proteins and uses thereof. U S Patent 6,352,836 March 5, 2002

26. Novoselov V.I., Amelina S.E., Kravchenko I.N., Novoselov S.V., Sadovnikov V.B., Fesenko E.E. Application of peroxiredoxine in the healing of lung. Problems of biological and ecological safety international conference. Obolensk p. 203 (22-25 May 2000)

27. Walker B.D., Lynn R. G. Peroxiredoxin drugs for treatment of HIV-1 infection and methods of use thereof. PCT appl. WO02077294(03.10.2002)

28. Андреева С.Г. и др. (1998) Структурные исследования секреторного 28кДа белка из обонятельного эпителия крысы. *Биоорганическая химия*, т.24, N11 с. 816-821

29. Sang Won Kang, Bains I.C., Rhee S.G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin contains one conserved cystein. *JBC*, 273, 11, pp. 6303-6311.

30. Chen J.W., Dodia C., Feinstein S.I., Mahendra K.J., Fisher A.B. (2000) 1-Cys Peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A activities. *JBC*, 275, 37, pp. 28421-28427.

31. Peshenko I.V., Shichi H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med* 2001 Aug 1;31(3):292-303.

32. Nagase T., Miyajima N., Tanaka A., Sazuka T., Seki N., Sato S., Tabata S., Ishikawa K., Kawarabayasi Y., Kotani H., and Nomura N. (1995) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. *DNA Res.*, 2, pp.37-43.

33. Knoops B., Clippe A., Bogard C., Arsalane K., Wattiez R., Hermans C., Duconseil E., Falmagne P., Bernard A. (1999) Clonning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* 274, pp. 30451-30458.

33. Dawson R.M., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. (1986) Data of Biochemical Research. Clarendon Press, Oxford,

34. Esenaliev R.O. Radiation and nanoparticles for enhancement of drug delivery in solid tumors. US Patent 6,165,440 (26.12.2000)

35. Thibeault D.W., Rezaiekhaligh M., Mabry S. and Beringer T. (1991) Prevention of chronic pulmonary oxygen toxicity in young rats with liposome encapsulated catalase administered intratracheally. *Pediatr. Pulmonol.*, 11:318-327.

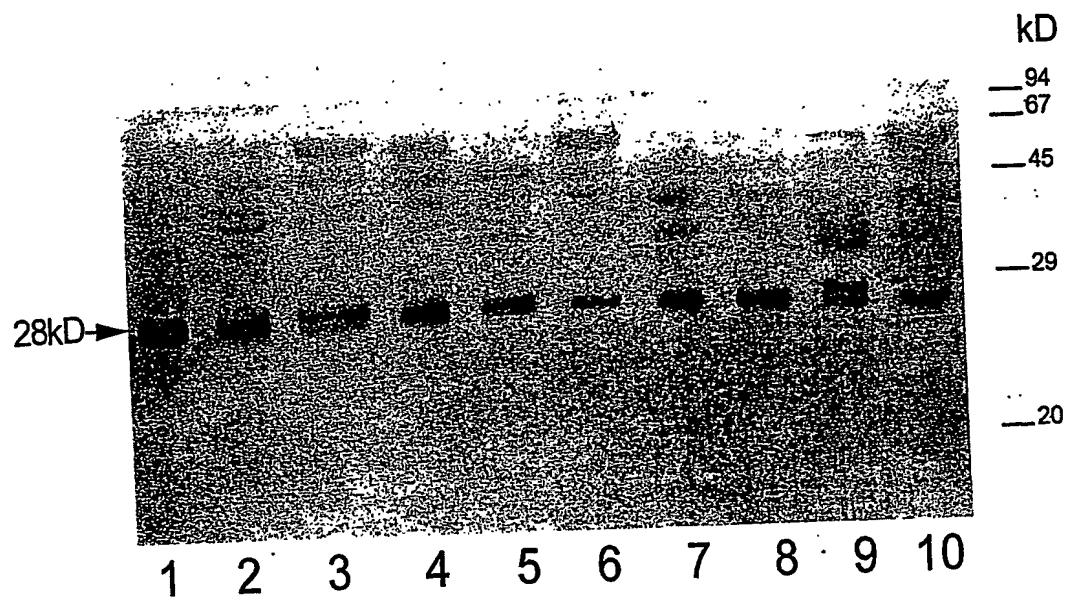
Формула

1. Фармацевтическая композиция для антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма в целом от гиперпродукции свободных радикалов, которая в качестве основного действующего вещества содержит эффективное количество пероксиредоксина или пероксиредоксин и дигидрогидролипоевую кислоту и фармацевтически приемлемые добавки в следующих соотношениях мас.%
 - iii) пероксиредоксин от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - iv) пероксиредоксин и дигидролипоевая кислота в сумме от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50(w/w).
2. Фармацевтическая композиция по п.1 отличающаяся тем, что пероксиредоксин выбирают из группы состоящей из: Prx I, Prx II, Prx III, Prx IV, Prx V и Prx VI.
3. Фармацевтическая композиция по п.1 отличающаяся тем, что используют пероксиредоксин Prx VI.
4. Способ повышения антиоксидантной защиты млекопитающих отличающийся тем, что осуществляют контакт фармацевтической композиции по пп. 1-3, с межклеточным пространством ткани, органа или всего организма млекопитающего.
5. Способ по п.4 отличающийся тем, что контакт с межклеточным пространством ткани, органа или организма в целом осуществляют либо посредством пассивной или активной диффузии при аппликации или распылении, либо за счет доставки с помощью инъекций в кровь, лимфу, спинномозговую жидкость.
6. Способ по п.4 отличающийся тем, что для доставки используют парентральное или эндолюмбальное введение с помощью инъекции, или используют парентральное введение с помощью инфузий, ингаляций, введение в дренаж, или используют сублингвальный, вагинальный, ректальный ввод, или используют капли в нос или глаза.

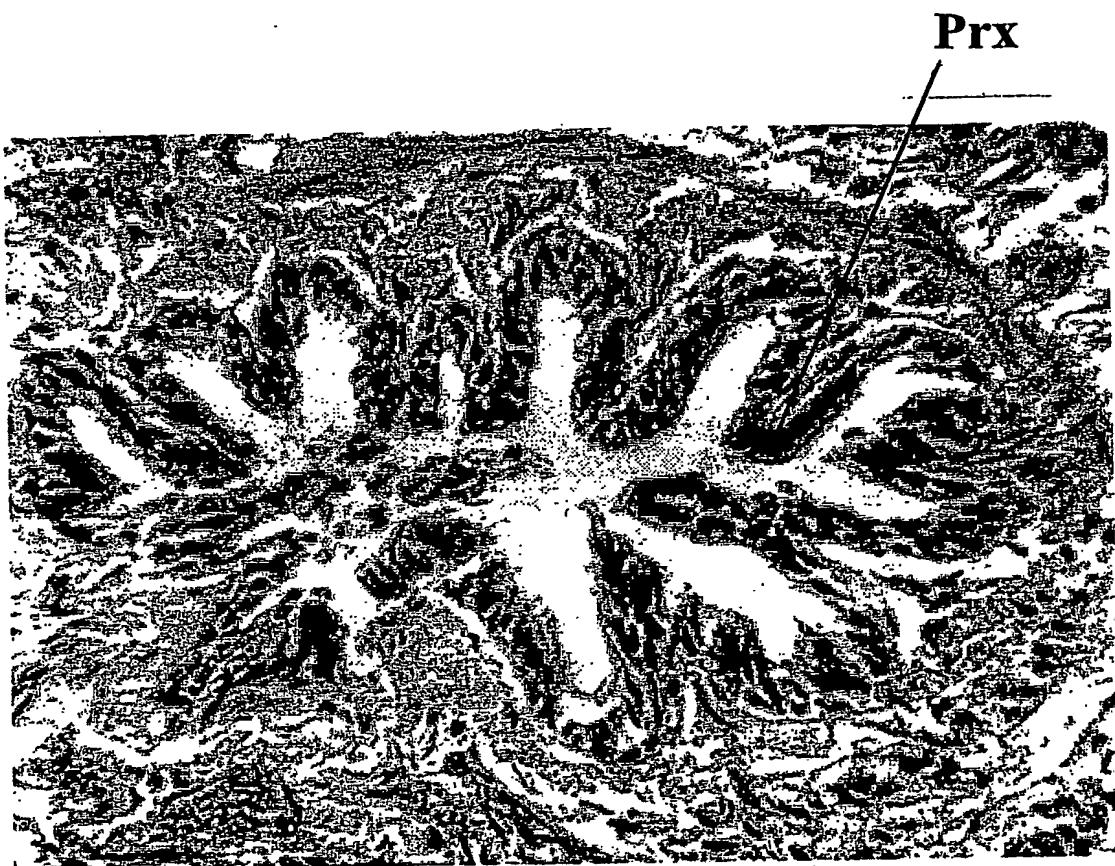
7. Способ по п.4 отличающийся тем, что дополнительно используют терапевтический агент, который применяют предварительно или одновременно или после применения композиции на основе пероксиродоксина.

8. Способ по п.7 отличающийся тем, что терапевтический агент выбирают из группы состоящей из: i) антибактериальных, антивирусных, антигрибных, антигистаминных препаратов, ii) высокомолекулярных ферментов, которые обеспечивают дополнительную защиту от свободных радикалов в межклеточном пространстве, iii) низкомолекулярных соединений, обеспечивающих дополнительное снижение уровня свободных радикалов внутри клетки, iv) препаратов используемых для трансплантации или криоконсервации органов, v) биологически активных белков, vi) гормонов, vii) витаминов, viii) цитокинов.

9. Способ по п.4 отличающийся тем, что антиоксидантную защиту от экзогенных и/или эндогенных факторов, вызывающих патологию, осуществляют предварительно и/или в процессе развития патологии и/или в течение восстановительного периода.

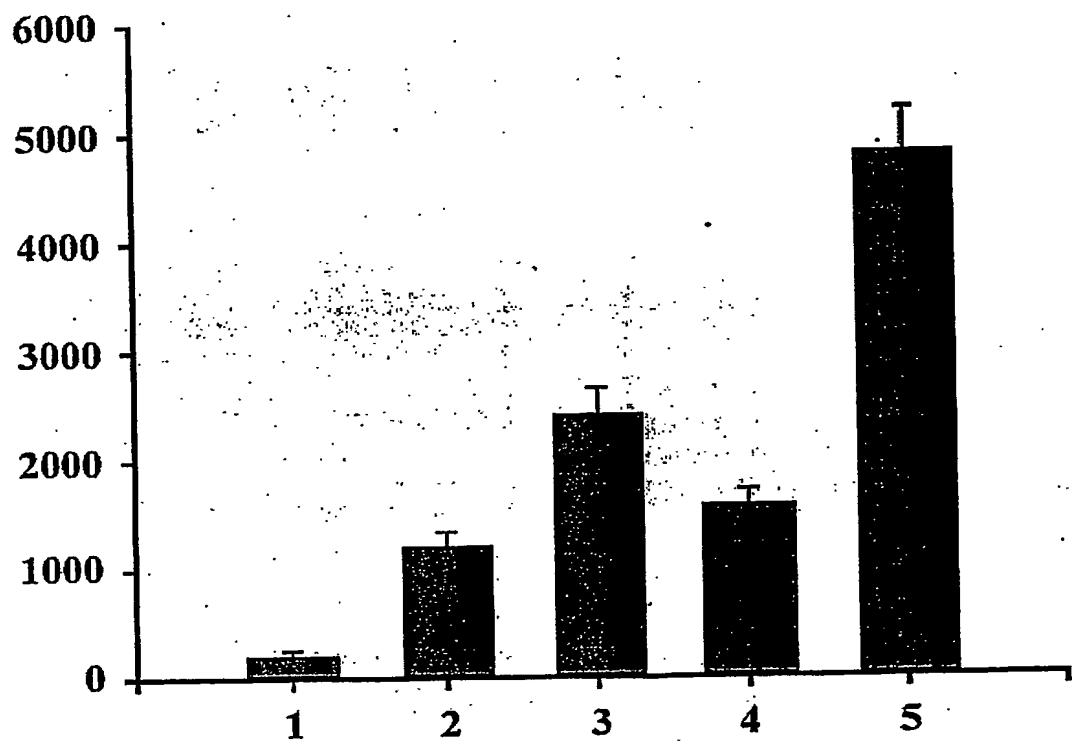


Фиг. 1

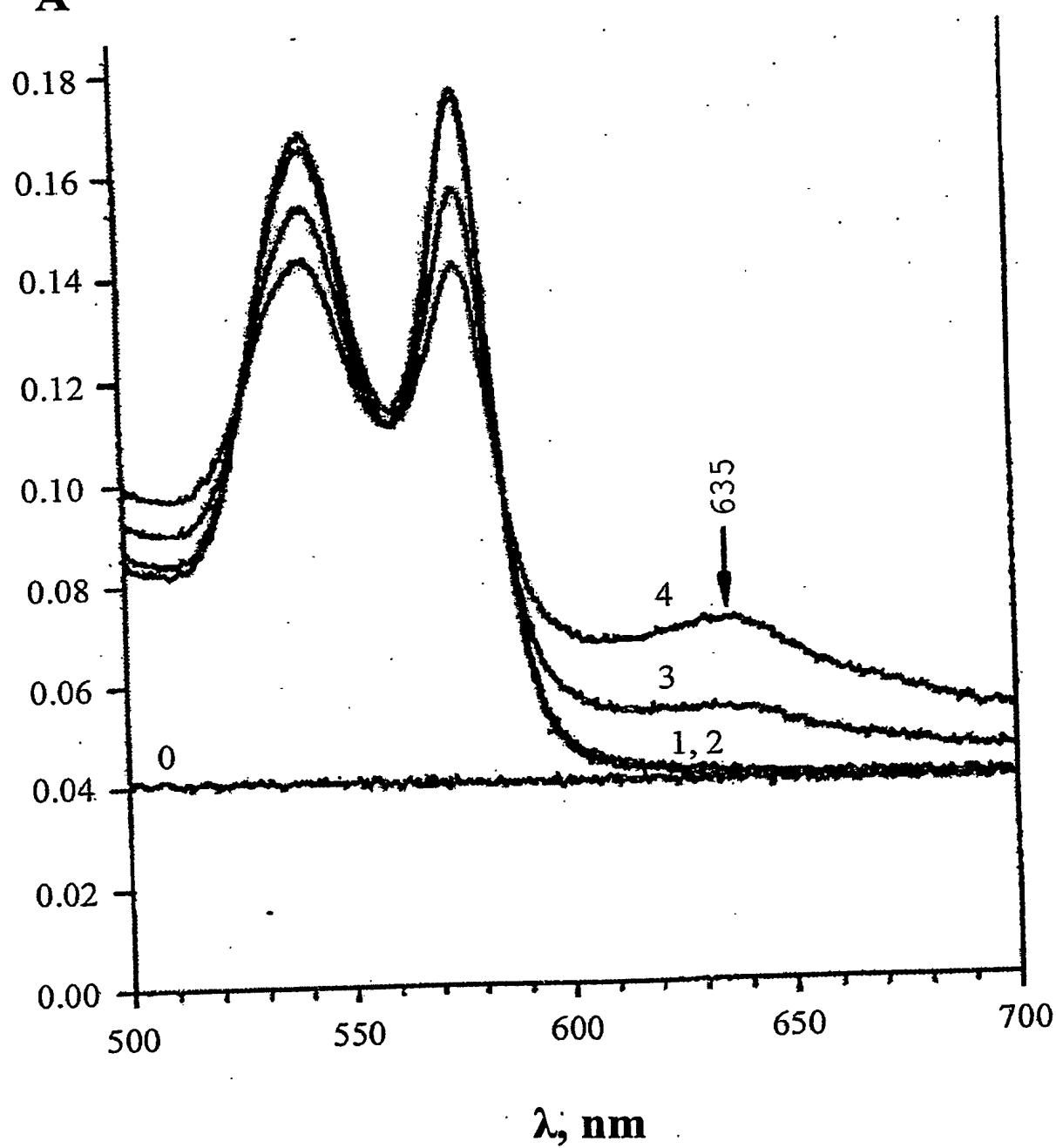


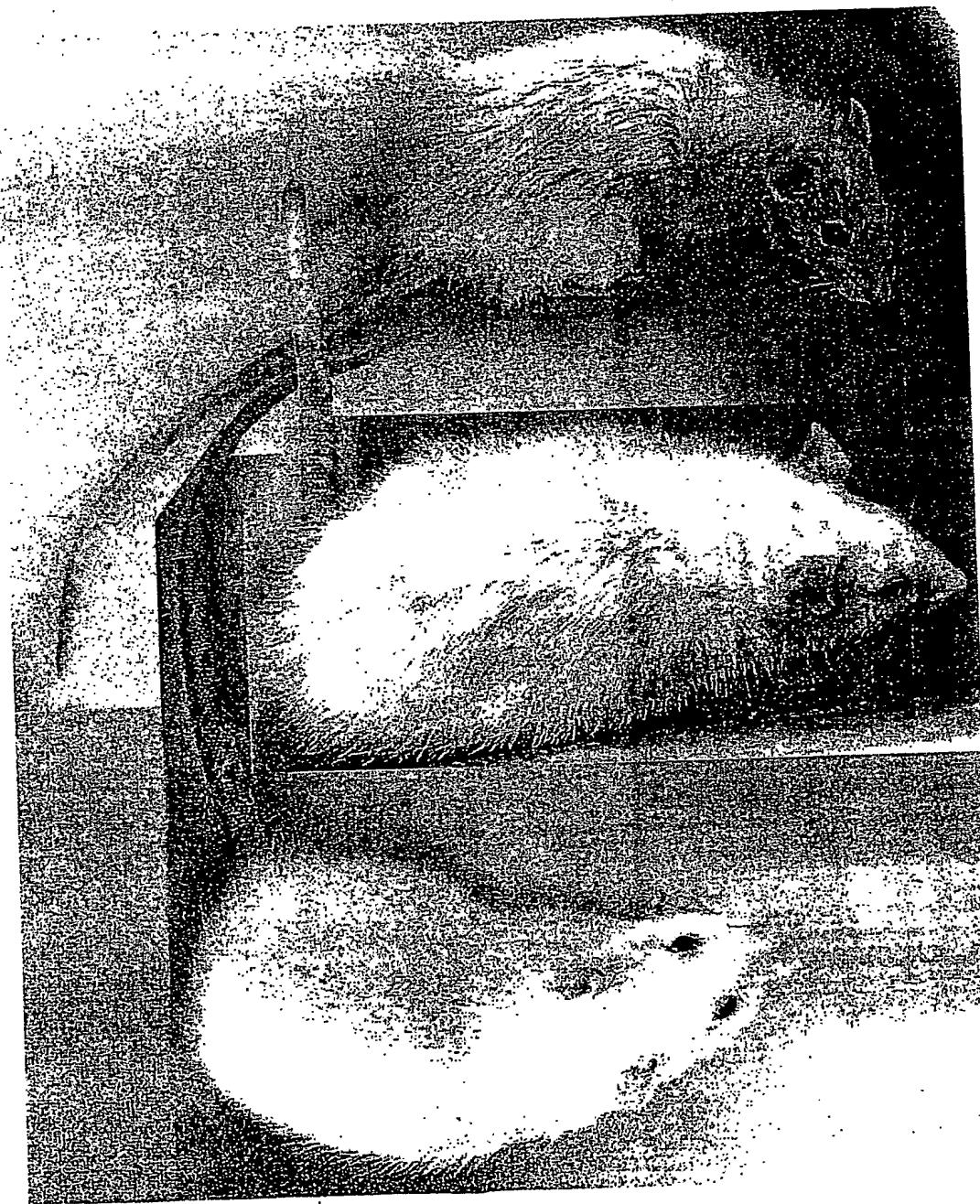
Фиг. 2

Cpm



Фиг. 3

A**Фиг. 4**



A

B

C

Фиг. 5

A



B



C



Фиг. 6

A



B

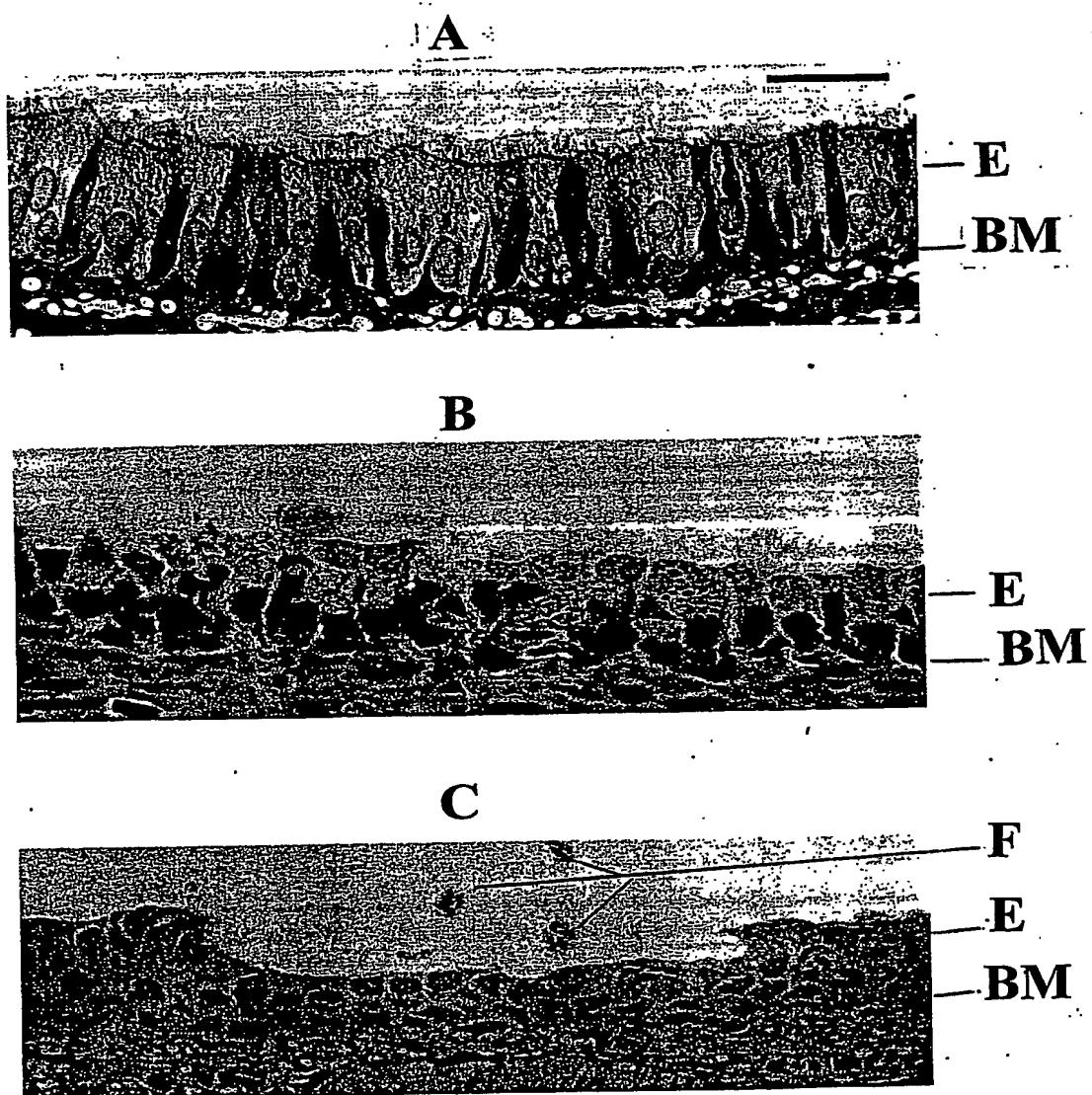
F



C

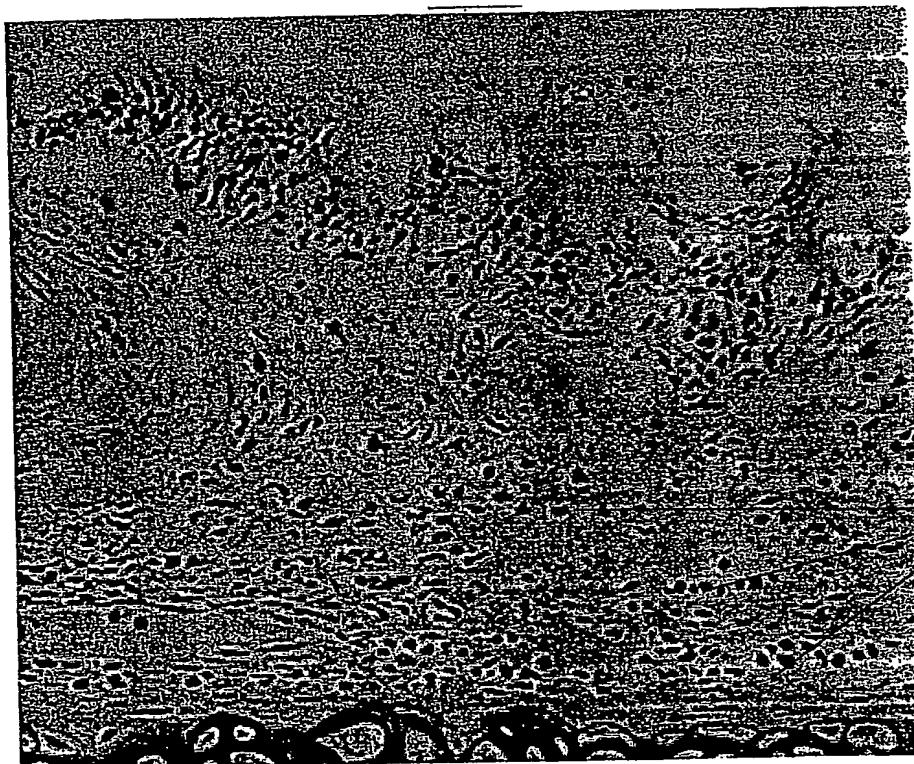


Фиг. 7



Фиг. 8

A

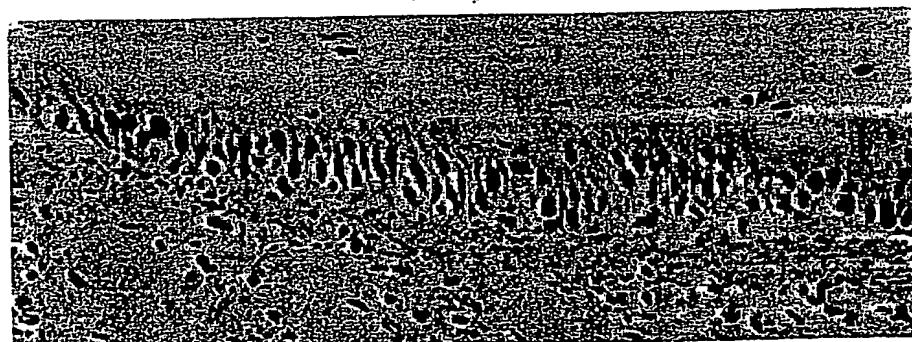


E

BM

F

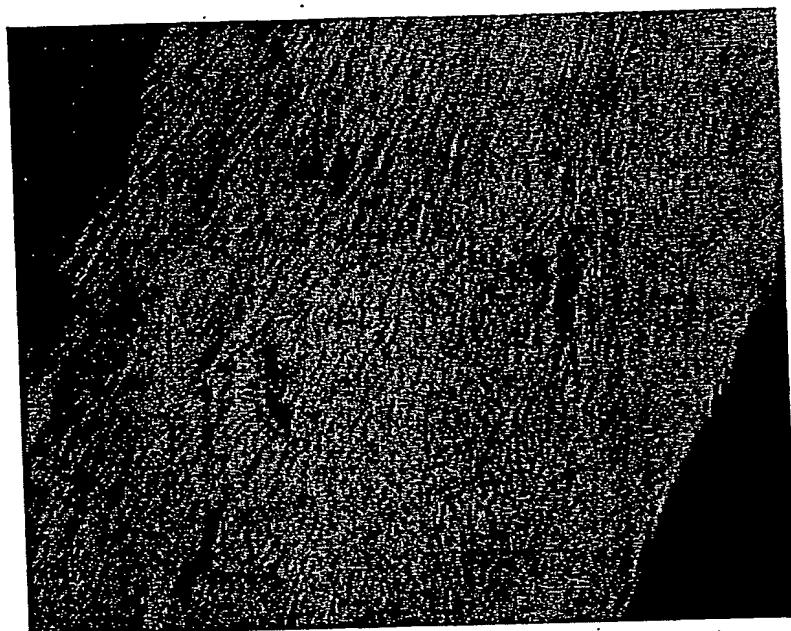
B



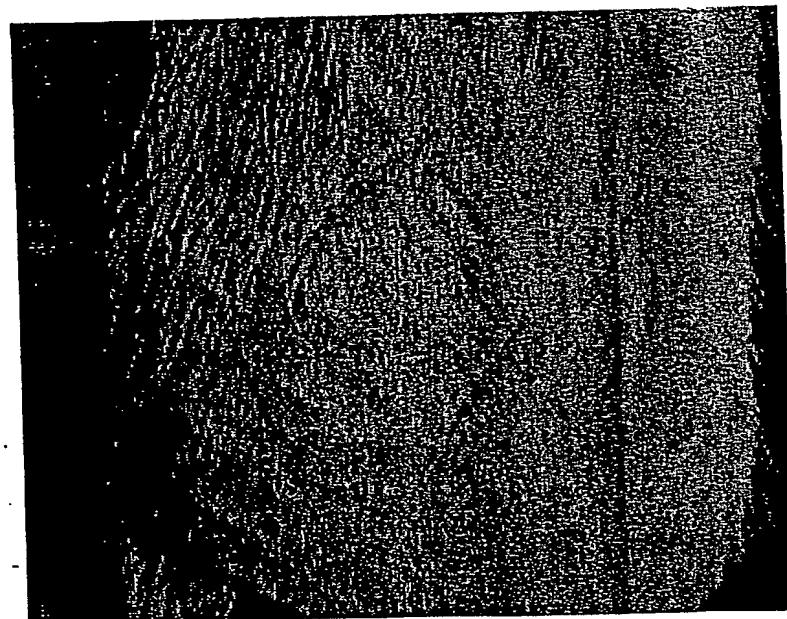
E

BM

Фиг. 9.

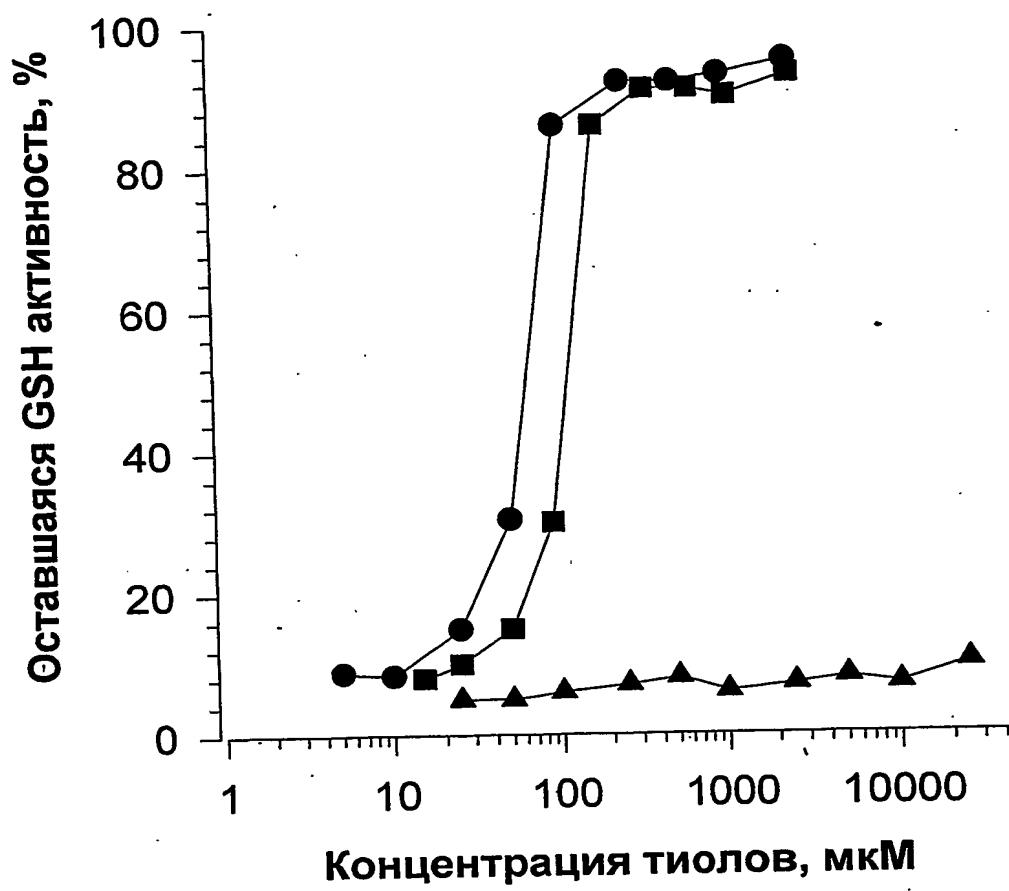


A



B

Фиг. 10



Фиг. 11

Реферат

Изобретение относится к не токсичной и эффективной композиции в качестве основного компонента которой является пероксиредоксин или пероксиредоксин и дигидролипоевая кислота. Композицию используют для повышения защитных свойств организма при воздействии экзогенных или эндогенных факторов вызывающих гиперпродукцию свободных радикалов.

Разработан способ профилактики или лечения млекопитающих, который основан том, что, обеспечивают контакт эффективного количества пероксиредоксина или пероксиредоксина и активатора с межклеточным пространством ткани, органа или всего организма млекопитающего.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.